

Evaluation of the *PRSS8* Gene Methylation Pattern in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Aida Mirza Aghasi¹, Saeid Ghorbian^{2,*}

¹ MSc in Genetics, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

² Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

* **Corresponding Author:** Saeid Ghorbian, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran. Email: s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

Abstract

Received: 03.10.2018

Accepted: 17.01.2019

How to Cite this Article:

Mirza Aghasi A, Ghorbian S. Evaluation of the *PRSS8* Gene Methylation Pattern in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Avicenna J Clin Med.* 2019; 25(4): 207-214. DOI: 10.21859/ajcm.25.4.207

Background and Objective: Esophageal cancer is the seventh cause of cancer deaths in the worldwide. Epigenetic changes including methylation of genes promoter can play an important role in the pathogenesis of esophageal squamous cell (ESCC). The aim of this investigation was to determine the *PRSS8* gene methylation pattern in patients with ESCC.

Materials and Methods: This case-control study was conducted on 150 paraffin blocks, including 75 paraffin blocks of cancerous tissues and 75 non-cancerous tissues paraffin blocks in ESCC patients. The Blocks in this study were from the archives of Noor-e-Nejat and Tabriz International Hospitals during 2013-2017. After DNA extraction and treatment with sodium metabisulfite, the *PRSS8* gene methylation promoter was evaluated using High Resolution Melting (HRM) method.

Results: The findings revealed that there was a significant difference between the cancerous tissues and non-cancerous tissues regarding the level of *PRSS8* gene methylation ($P=0.026$). In addition, the relationship between *PRSS8* gene methylation and metastasis revealed no significant change in terms of clinicopathological parameters ($P=0.007$).

Conclusion: The present investigation showed that the *PRSS8* gene promoter hypermethylation can play a critical role in the carcinogenesis and metastasis of ESCC.

Keywords: DNA Methylation, Esophageal Neoplasms, Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Serine Protease Prostaticin 8

بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* در مبتلایان به کارسینومای سلول‌های سنگ‌فرشی مری

آیدا میرزا آقاسی^۱، سعید قربان^{۲*}

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
^۲ استادیار، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

* نویسنده مسئول: سعید قربان، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.
ایمیل: s_ghorbani@iau-ahar.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: سرطان مری هفتمین عامل مرگ ناشی از سرطان در جهان است. تغییرات اپی‌ژنتیکی از جمله میزان متیلاسیون پروموتور ژن‌ها می‌توانند در شکل‌گیری کارسینومای سلول‌های سنگ‌فرشی مری نقش داشته باشند. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف تعیین الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگ‌فرشی مری انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی که در ارتباط با ۱۵۰ نمونه بلوک پارافینی شامل: ۷۵ بلوک بافت سرطانی و ۷۵ بلوک بافت سالم موجود در آرشیو بیمارستان‌های "نور نجات" و "بین‌المللی تبریز" طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۶ انجام شد، پس از استخراج DNA و تیمار با متابی سولفیت سدیم، تغییرات میزان متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* با استفاده از روش HRM (High Resolution Melting) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که بین تغییرات میزان متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های سالم اختلاف معناداری وجود دارد ($P=0/026$). در این مطالعه میزان فراوانی متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* با مشخصات توموری بیماران مورد ارزیابی قرار گرفت که به لحاظ آماری اختلاف معناداری با متاستاز مشاهده نگردید ($P=0/007$).

نتیجه‌گیری: هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* می‌تواند نقش مهمی در سرطان‌زایی و متاستاز کارسینومای سلول‌های سنگ‌فرشی مری داشته باشد.

واژگان کلیدی: سرطان مری، سرین پروستازین پروتئاز ۸، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی مری، متیلاسیون DNA

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۲۷

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مقدمه

خطر در EAC و ESCC با یکدیگر متفاوت هستند و عوامل محیطی و رژیم غذایی به شدت با ESCC در ارتباط می‌باشند؛ این در حالی است که رفلکس مکرر جری‌ان برگ‌شستی معدی-مری، واکنش‌های التهابی پس از آن و مری بارت نقش بسیار مهمی را در شکل‌گیری EAC ایفا می‌کنند [۴].

بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که خاموشی یا کاهش بیان ژن‌های سرکوب‌گر تومور می‌تواند یکی از دلایل عمده سرطان‌زایی مری باشد. هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های سرکوب‌گر تومور منجر به خاموشی و تنظیم کاهش‌ی بیان ژن می‌شود که این امر با تشکیل و پیشرفت تومور ارتباط دارد [۵]. ژن *PRSS8* سرین پروتئاز ۸ (Serine Protease Prostaticin)، یک سرین پپتیداز شبه تریپسین را رمز می‌کند که در بافت‌های ESCC و رده‌های سلولی ESCC دستخوش تغییرات هیپرمتیلاسیون می‌شود [۶].

مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده‌ای در کشورهای متفاوت در زمینه عوامل خطر، بروز و شیوع سرطان مری انجام شده است. در ایالات متحده آمریکا و کشورهای غربی که از وضعیت اقتصادی خوبی بهره‌مند هستند، سرطان مری به دو فرم EAC (Esophageal Adenocarcinoma) و ESCC (Esophageal Squamous Cell Carcinoma) تقسیم‌بندی می‌شود که فراوانی EAC بیشتر از ESCC گزارش شده است [۱]. در سال ۲۰۰۹ در ایالات متحده آمریکا، EAC دو سوم از موارد سرطان مری را به خود اختصاص داده بود [۲]. مطالعات انجام‌شده در ایران نشان‌دهنده میزان بالای خطر ابتلا به سرطان مری در نواحی ساحلی دریای خزر و استان‌های شمالی ایران می‌باشند [۳]. این سرطان مانند سایر سرطان‌ها حاصل مجموعه عوامل محیطی و تغییرات ژنتیکی است. عوامل

پارافینی مشتعل بر ۷۵ بلوک پارافینی بافت سرطان مری و ۷۵ بلوک پارافینی بافت سالم که طی ارزیابی با آندوسکوپی در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان های "نور نجات" و "بین‌المللی تبریز" طی سال‌های ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۶ دریافت شده بود، انجام شد. تعیین حجم نمونه با استفاده از فرمول کوکران با در نظر گرفتن $(P=0/07)$ (نسبتهی از جمعیت دارای صفت معین)، مقدار متغیر نرمال واحد استاندارد در میزان اطمینان ۹۵ درصد $(Z=1/96)$ و میزان خطای قابل تحمل $(d=0/04)$ معادل ۷۵ نمونه برآورد گردید. نمونه‌هایی که در مسیر فرایند درمانی تحت رادیوتراپی و شیمی‌درمانی قرار نگرفته بودند، وارد مطالعه شدند. شایان ذکر است تمامی نمونه‌هایی که در مورد آن‌ها تشخیص قطعی سرطان مری داده شده بود به‌عنوان گروه مورد و نمونه‌هایی که پس از آندوسکوپی و بررسی‌های پاتولوژی، بدخیم تشخیص داده نشدند به‌عنوان گروه شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند.

این مطالعه به‌صورت کاملاً محرمانه و با رعایت کامل موازین اخلاقی انجام شد (به‌طوری که هویت نمونه‌های مورد بررسی کاملاً ناشناخته بودند و با کد اختصاری نام‌گذاری شدند) و از هر بلوک پارافینی دو برش ۱۵ میکرومتری تهیه گردید.

استخراج DNA از بلوک پارافینی

برای استخراج DNA از بلوک پارافینی از کیت NucleoSpin® DNA FFPE XS مطابق با دستورالعمل پیشنهادی کیت استفاده گردید. پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت آن تعیین شد که برای این منظور از دو روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و اسپکتروفتومتری UV بهره گرفته شد.

متابلی سولفیتاسیون DNA/ استخراج شده

برای ارزیابی میزان تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن هدف از تیمار با متابلی سولفیت سدیم با استفاده از کیت اختصاصی EpiMark®. Bisulfite Conversion (به شماره کاتالوگ E3318S) مطابق با دستورالعمل پیشنهادی کیت انجام شد.

بررسی الگوی متیلاسیون ژن PRSS8 به روش HRM

برای اندازه‌گیری میزان تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 از دستگاه Eco (شرکت Eco Biosystems) استفاده شد. در این مرحله، جفت آغازگرهای مربوط به هر ژن (Accession Number: NC_000016.10) با استفاده از نرم‌افزار MethPrimer طراحی گردید [۱۴] و اختصاصیت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

در این مرحله واکنش‌ها با استفاده از رنگ Eva green I (ساخت شرکت فرمنتاز فرانسه) و براساس مقادیر نشان‌داده‌شده در جدول ۲ انجام شد. این رنگ طی واکنش Real-time PCR

علاوه‌براین، PRSS8 که به پروستازین شناخته شده است، بیان بالایی در مایع منی و غده طبیعی پروستات دارد [۷]. مطالعات حاکی از آن هستند که PRSS8 بیان بسیار بالایی در سلول‌های اپیتلیال بافت‌های گوناگون دارد و در تمایز اپیتلیال و عملکردهای مهمی از جمله کارکرد سد اپیدرمال، فنوتیپ‌های پوستی و زنده‌مانی رویان نقش دارد [۸]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سطح PRSS8 سرمی در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان افزایش می‌یابد؛ اما بیان PRSS8 در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان مقاوم به شیمی‌درمانی و رده سلولی مقاوم به شیمی‌درمانی کاهش می‌یابد [۹]. علاوه‌براین افزایش بیان PRSS8، مرگ سلول‌ها را در رده‌های سلولی سرطان تخمدان القا می‌کند. بر مبنای نتایج، بیان PRSS8 در سرطان‌های پروستات، پستان، مثانه و معده با کاهش همراه بوده است که این مهم حاکی از نقش مهارکنندگی تومور می‌باشد. در سرطان پروستات کاهش بیان ژن PRSS8 با هیپرمتیلاسیون PRSS8 در ارتباط می‌باشد؛ اما جایگاه متیلاسیون و نقش آن در فرایندهای بیولوژیکی نامشخص باقی مانده است [۱۰-۱۳]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 احتمالاً نقش مهمی را در شکل‌گیری ESCC ایفا می‌کند که گواه این مسأله، بیان مجدد ژن PRSS8 از طریق دمتیلاسیون در سلول‌های ESCC با نشان‌دادن کارکردهای معکوس می‌باشد [۱۴]. با وجود پیشرفت‌های اخیر در تشخیص و درمان سرطان‌ها، کارسینوم سلول سنگ‌فرشی مری هنوز به‌عنوان یکی از مرگ‌بارترین سرطان‌ها به شمار می‌رود. یکی از دلایل پیش‌آگاهی ضعیف آن بروز متاستاز لنفاوی در مراحل اولیه است؛ بنابراین، تشخیص و درمان زودهنگام آن برای بیماران ESCC ضروری می‌باشد [۸، ۱۱، ۱۲]؛ اما متأسفانه در ارتباط با بیشتر بیماران، این بیماری در مرحله آخر که غالباً با متاستازهای گسترده به گره‌های لنفاوی همراه شده است، تشخیص داده می‌شود [۱۵]. براساس جستجو و بررسی‌های به‌عمل‌آمده از سوی نویسندگان در پایگاه‌های اطلاعاتی و استنادی، تاکنون تنها یک مطالعه در جمعیت چینی در ارتباط با ارزیابی الگوی متیلاسیون ژن PRSS8 در مبتلایان به ESCC انجام شده است [۱۴]. با وجود مطالعات متعددی که در مورد شناسایی مکانیسم ایجاد و پیشرفت ESCC صورت گرفته‌اند، هنوز ناشناخته‌های زیادی در این مورد وجود دارد؛ بنابراین، شناسایی بیومارکرهایی که مکانیسم تومورزایی و یا پیش‌آگاهی ESCC را به‌منظور کنترل و بهبود فرایند درمانی نشان دهند، یک نیاز اساسی خواهد بود. برای این منظور و با توجه به اهمیت موارد ذکرشده، این مطالعه با هدف تعیین الگوی متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 در بیماران مبتلا به ESCC مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های "نور نجات" و "بین‌المللی شهر تبریز" انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه مورد- شاهدی حاضر در ارتباط با ۱۵۰ بلوک

جدول ۱: اندازه محصول PCR (Polymerase Chain Reaction) و توالی آغازگرها برای مطالعه الگوی متیلاسیون ژن PRSS8 در مبتلایان به ESCC

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه محصول PCR (Polymerase Chain Reaction)
PRSS8-F PRSS8-R	5'-AGGGGATAGATTATAGTGTTTTAAGTTTTATAATTAG-3' 5'-ACTCTCCTCCRCCTCAAATCTTTCAAATTATC-3'	۱۵۸ جفت باز

به منظور ترسیم نمودار استاندارد از سریال رقت (۰، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد) DNA متیله شده (شرکت SssI Methylase Zymo Research, USA) و DNA غیرمتیله شده لکوسیت‌های خون محیطی بهره گرفته شد. به منظور محاسبه کمی میزان شدت متیلاسیون نیز از روش مقایسه‌ای با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده گردید. لازم به ذکر است که از DNA غیرمتیله شده لکوسیت‌های خون محیطی به عنوان مرجع استفاده گردید و مقادیر متیلاسیون به دست آمده به صورت درصد نشان داده شدند. علاوه بر این، برای ارزیابی کمی درصد میزان متیلاسیون هنگامی که سطح متیلاسیون ژن PRSS8 از میانگین سطح متیلاسیون در نمونه‌های غیرسرطانی بالاتر بود، به عنوان متیله شده لحاظ گردید.

به منظور تحلیل داده‌ها نیز از آزمون مجذور کای بر حسب فاکتورهای مورد بررسی از جداول، اشکال، فراوانی و درصد استفاده شد. علاوه بر این، آنالیزهای آماری مربوط به اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار SPSS 25 صورت گرفت و $(P < 0/05)$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

جدول ۲: اجزای واکنش Real-time PCR برای ارزیابی تغییرات الگوی متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8

حجم (میکرولیتر)	اجزای واکنش
۱۰	Eva Green Real-time PCR Master Mix
۰/۳	آغازگر مستقیم (10pmol/μl)
۰/۳	آغازگر معکوس (10pmol/μl)
۷/۴	آب مقطر
۲	DNA بی سولفیت
۲۰	حجم کل

به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. جهت تکثیر قطعه مورد نظر مطابق با شرایط دمایی و زمانی جدول ۳، تغییرات متیلاسیون در پروموتور ژن PRSS8 مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت انجام واکنش، تمامی نمونه‌ها به صورت دوتایی (Duplicate) مورد ارزیابی قرار گرفتند و از چندین نمونه کنترل فاقد الگو در هر سری واکنش استفاده گردید. همچنین،

جدول ۳: شرایط دمایی و زمانی تکثیر Real-time PCR

مرحله	زمان	دما
واسرشت‌سازی اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
واسرشت‌سازی	۱۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
اتصال و تکثیر	۶۰ ثانیه	۶۰ درجه سانتی‌گراد

یافته‌ها

نیامد ($P=0/304$). شایان ذکر است که از میان ۷۵ نمونه سرطانی در ۳۰ مورد (۴۰ درصد) پروموتور ژن هیپومتیله و در ۴۵ مورد (۶۰ درصد) هیپرمیتیلاسیون در پروموتور ژن PRSS8 شناسایی گردید. درصد میزان متیلاسیون در نمونه‌های سرطانی در مراحل مختلف، متفاوت به دست آمد؛ به طوری که درصد هیپرمیتیلاسیون نمونه‌ها در مرحله اول ۲۷ درصد، مرحله دوم ۷۲ درصد، مرحله سوم ۷۳ درصد و در مرحله چهارم ۳۳ درصد گزارش شد. باید خاطرنشان ساخت که میزان درصد متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 در نمونه‌های بافت سرطانی در مقایسه با نمونه‌های سالم متفاوت بود و از نظر آماری، اختلاف معناداری بین آن‌ها به دست نیامد ($P=0/026$) (شکل ۱).

علاوه بر این، در این مطالعه فراوانی تغییرات متیلاسیون با پارامترهای بالینی و اطلاعات جمعیت‌شناختی بیماران مبتلا به ESCC مورد بررسی قرار گرفت که با متاستاز ($P=0/008$) و

در این مطالعه الگوی متیلاسیون پروموتور PRSS8 در ۱۵۰ نمونه بلوک پارافینی که شامل: ۷۵ بلوک پارافینی بافت سرطان مری و ۷۵ بلوک پارافینی بافت سالم بودند، با استفاده از روش HRM مورد ارزیابی قرار گرفتند.

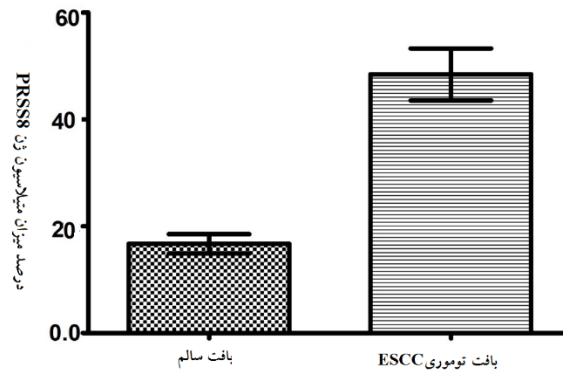
ابتدا کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop™ ND-1, 000, NanoDrop Technology, Wilmington, DE, USA) و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس نتایج HRM، میزان تغییرات متیلاسیون به صورت هیپومتیلاسیون و یا هیپرمیتیلاسیون پروموتور ژن هدف در نمونه‌های بافت سرطانی به دو گروه تقسیم‌بندی شدند.

میانگین سنی افراد در مرحله تشخیص در گروه هیپومتیلاسیون $58/6 \pm 1/6$ سال و در گروه هیپرمیتیلاسیون $60/9 \pm 1/3$ سال بود که اختلاف معناداری در این زمینه به دست

اجتماعی و مصرف سیگار سیگار اختلاف معناداری به دست نیامد ($P > 0.05$) (جدول ۴).

مصرف نوشیدنی‌های داغ ($P = 0.007$) به لحاظ آماری اختلاف معناداری مشاهده شد؛ اما با مرحله بیماری، نوشیدن الکل، شرایط



شکل ۱: میزان تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 در نمونه‌های بافت توموری ESCC نسبت به نمونه‌های بافت سالم

جدول ۴: فراوانی متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 بر حسب اطلاعات جمعیت‌شناختی و بالینی بیماران مبتلا به ESCC

مشخصات	هیپرمتیلاسیون تعداد (درصد)	هیپومتیلاسیون تعداد (درصد)	معناداری
بیماری مرحله یک، دو، سه و چهار			
	۳۳ (۴۴)	۱۱ (۱۵)	۰/۲۰۵
	۱۹ (۲۵)	۱۲ (۱۶)	
متاستاز			
مثبت	۱۱ (۱۵)	۲۱ (۲۸)	۰/۰۰۸
منفی	۲۸ (۳۷)	۱۵ (۲۰)	
نوشیدنی‌های داغ			
زیاد	۲۱ (۲۸)	۵ (۷)	۰/۰۰۷
کم	۲۴ (۳۲)	۲۵ (۳۳)	
نوشیدن الکل			
بله	۲۳ (۳۱)	۲۱ (۲۸)	۰/۴۳۹
خیر	۱۹ (۲۵)	۱۲ (۱۶)	
شرایط اجتماعی			
خوب	۳۲ (۴۳)	۲۳ (۳۱)	۰/۸۸۸
ضعیف	۱۲ (۱۶)	۸ (۱۰)	
مصرف سیگار			
زیاد	۲۱ (۲۸)	۱۲ (۱۶)	۰/۵۶۹
کم	۲۴ (۳۲)	۱۸ (۲۴)	

بحث

می‌تواند یکی از علل عمده سرطان‌زایی در ESCC باشد. هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن‌های سرکوب‌گر تومور منجر به خاموشی و تنظیم کاهشی بیان ژن می‌شود که این امر با تشکیل و پیشرفت تومور ارتباط مستقیمی دارد [۵]. یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از آن هستند که میزان متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 در نمونه‌های بافت سرطانی نسبت به بافت سالم بیماران ESCC افزایش معناداری دارد که این مهم با نتایج مطالعه باثو و همکاران [۱۴] کاملاً منطبق است.

براساس جستجوهای به‌عمل‌آمده، تنها مطالعه‌ای که در

سرطان ESCC یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان است که بروز آن در سال‌های اخیر در کشورهای آسیایی رو به افزایش بوده و به‌عنوان هفتمین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان به شمار می‌رود. این سرطان میزان بقای پنج‌ساله بسیار ضعیفی دارد [۲]. مکانیسم‌های اساسی شکل‌گیری این سرطان عمدتاً نامعلوم می‌باشند؛ اگرچه مطالعات همه‌گیرشناختی و سبب‌شناختی، نقش مهم عوامل محیطی و ژنتیکی را در سرطان‌زایی ESCC نشان داده‌اند. بسیاری از مطالعات گزارش نموده‌اند که سرکوب یا کاهش بیان ژن‌های سرکوب‌گر توموری

داد [۱۹].

در مطالعات مختلف غیرفعال‌سازی ژن‌های سرکوب‌گر القا شده با هیپرمتیلاسیون پروموتور ژن هدف در فرایند چندمرحله‌ای سرطان‌زایی مشاهده شده است. مکانیسم مولکولی که PRSS8 تکثیر سلول سرطانی و متاستاز را مهار می‌کند، تا حدی نامشخص می‌باشد؛ اما براساس نتایج مطالعات انجام‌شده، نقش ضد توموری PRSS8 با تنظیم منفی در مسیر انتقال پیام Sphk1/S1P/Stat3 در ارتباط بوده و نقش ویژه‌ای در فرایندهای مختلف مهم سلولی از قبیل رشد سلول، بقا و تهاجم آن دارد [۲۰].

در بررسی‌های که در ارتباط با سرطان تخمدان صورت گرفته‌اند، مشخص شده است که عملکرد مهارکنندگی توموری PRSS8 به واسطه مسیر p34-(PAK2)-P21-CASP/Activated Protein Kinase و به دنبال آن مسیر انتقال پیام PAK2-p34/JNK/c-jun و PAK2-p34/mlck/actin انجام می‌شود [۲۱].

از سوی دیگر، در مطالعه ژانگ و همکاران در مورد نمونه‌های کارسینومای هپاتوسلولار نشان داده شده است که بیان بیش از حد ژن PRSS8 می‌تواند منجر به افزایش سطح پروتئین PTEN، کاهش سطح بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش بیان Bax گردد. نسبت پروتئین Bcl-2 (مهارکننده آپوپتوزیس) و پروتئین Bax (القاکننده آپوپتوزیس) به‌عنوان شاخص بقا و یا مرگ سلولی در پاسخ به تحریک‌کننده‌های آپوپتوزیس به شمار می‌رود [۲۲]. نتایج این مطالعه نشان دادند که اثرات مهاري رشد سلول‌های کارسینومای هپاتوسلولار از طریق فعال‌سازی مسیر داخلی آپوپتوزیس انجام می‌شود. براساس شواهد موجود، EMT (Epithelial-mesenchymal Transition) در فرایند متاستاز توموری نقش دارد؛ به‌طوری که EMT با توسعه زیاد و یا کاهش بیان اتصالات محکم سلولی که در رأس سلول‌های اپیتلیال از قبیل E-کاده‌هرین و سیتوکراتین و نیز بیان مولکول‌های مزانشیمی جدید N-کاده‌هرین قرار دارند، تأثیر خواهد گذاشت [۲۳].

علاوه‌براین، ژانگ و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که القای بیان مجدد PRSS8 در سلول‌های رده HCCLM3 با توان متاستاز زیاد، تکثیر و تهاجم سلول‌ها را مهار می‌نماید و در مقابل، عدم بیان PRSS8 در سلول‌های HepG2 فاقد قدرت متاستاز باعث افزایش رشد و تهاجم سلولی می‌شود. علاوه‌براین، نتایج نشان دادند که بیان PRSS8 در سلول‌های HepG2 به شدت باعث افزایش رشد تومور می‌شود؛ درحالی که بیان بیش از حد PRSS8 موجب کاهش رشد تومور در مدل xenograft HCCLM3 می‌گردد. لازم به ذکر است که رشد سلول‌های پیشرفته و توانایی تهاجم به وسیله کاهش بیان PRSS8 ناشی از کاهش PTEN، Bax و E-کاده‌هرین و نیز تعدیل در Bcl-2 و N-کاده‌هرین می‌باشد.

از سوی دیگر، چن و همکاران در مطالعه‌ای میزان بیان ژن

ارتباط با ارزیابی میزان تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن PRSS8 و نقش آن در سرطان‌زایی به‌دست آمد، مطالعه Bao و همکاران بود که با روش Tissue Microarray در ارتباط با ۳۶۲ نمونه بافتی ESCC و رده‌های سلولی کارسینومای مری انجام شده بود. نتایج این مطالعه نشان دادند که میزان بیان ژن PRSS8 در سطوح mRNA و پروتئین کاهش یافته است. از سوی دیگر، کاهش بیان با میزان بقای کم بیماران ESCC همراه می‌باشد. در بررسی تغییرات متیلاسیون این ژن نشان داده شده است که در نمونه‌های بافتی و رده‌های سلول سرطانی، هیپرمتیلاسیون حادث می‌گردد که با کاهش بیان PRSS8 و کارایی عملکرد پروموتور در ارتباط می‌باشد. همچنین، گزارش شده است که استفاده از ترکیبات دمتیله‌کننده قادر به بیان مجدد ژن PRSS8، مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، تحرک، مهاجرت و توقف چرخه سلولی می‌باشند. نتایج این مطالعه حاکی از آن بودند که اثرات ضد توموری PRSS8 با تکثیر و تغییر پروتئین‌های مرتبط با مزانشیمال اپیتلیال در سلول‌های ESCC در ارتباط است.

PRSS8 یک گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI: Glycosylphosphatidylinositol) متصل به سرین پروتئاز می‌باشد که در بسیاری از بافت‌ها از جمله روده کوچک، روده بزرگ، مری، معده، ریه، پوست، کبد، پروستات، کلیه و کیسه صفرا بیان می‌شود [۱۲]. به‌طور کلی، PRSS8 نقش مهمی را در مانع‌آپیدرمی به‌ویژه در تنظیم هومئوستاز گلوکز ایفا می‌کند [۱۶]. مطالعات بالینی متعددی نشان داده‌اند که بیان ژن PRSS8 در سرطان‌های متعدد به دلیل هیپرمتیلاسیون کاهش یافته است؛ اما اساس مولکولی مکانیسم‌های آن مشخص نمی‌باشد. باید خاطر نشان ساخت که بیان ژن PRSS8 در سرطان مری و روده بزرگ، ارتباط معکوسی را با پیش‌آگاهی نشان داده است [۱۷].

در این راستا، نتایج مطالعات کپنر و همکاران گویای آن بودند که حذف ژن هدف PRSS8 در موش صحرائی منجر به بروز التهاب روده ناشی از سولفات دکستران سدیم می‌شود [۱۸]. با این وجود، عملکرد زیستی PRSS8 در آغاز و پیشرفت سرطان تا حد زیادی ناشناخته باقی‌مانده است.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که تغییرات اپی‌ژنتیکی، نقش پاتولوژیکی را در شروع و پیشرفت سرطان ایفا می‌کنند. متیلاسیون DNA یک فرایند آنزیمی است که شامل افزودن گروه متیل به جایگاه پنج حلقه پیریمیدین سیتوزین‌ها جهت تولید ۵-متیل سیتوزین می‌باشد. این تغییر کووالانسی از طریق DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs: DNA Methyltransferases) در قسمت‌های کوتاه DNA غنی از CpG معروف به جزایر CpG کاتالیز می‌شود. جزایر CpG روی ناحیه پروموتور قرار گرفته‌اند و برای پروموتورهایی که به‌طور نابه‌جا دستخوش هیپرمتیلاسیون می‌شوند، سرکوب رونوشتی به لحاظ کاهش بیان ژن روی خواهد

پروستات داشته باشد [۲۴].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از بررسی الگوی متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS8* با استفاده از روش HRM در نمونه‌های بلوک پارافینی سرطانی در مقایسه با بافت سالم نشان دادند که اختلاف معناداری در سطح متیلاسیون وجود دارد؛ به طوری که در نمونه‌های سرطانی، میزان متیلاسیون پروموتور ژن هدف افزایش یافته بود. لازم به ذکر است که به منظور تأیید نقش و اهمیت میزان تغییرات در سطح متیلاسیون پروموتور یک ژن با شکل‌گیری ESCC مطالعات بیشتری مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک با کد مصوب ۹۵۱۰۱۲ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر بوده و هزینه آن توسط خود دانشجو تأمین شده است. بدین‌وسیله از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش مشارکت نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد. شایان ذکر می‌باشد که هیچ‌گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر گزارش نشده است.

REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;**62**(5):283-98. PMID: 22987332 DOI: 10.3322/caac.21153
2. Ohashi S, Miyamoto S, Kikuchi O, Goto T, Amanuma Y, Muto M. Recent advances from basic and clinical studies of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;**149**(7):1700-15. PMID: 26376349 DOI: 10.1053/j.gastro.2015.08.054
3. Hosseintabar Marzoni AS, Moghimbeigi A, Faradmal J. Gastric and esophageal cancers incidence mapping in Golestan Province, Iran: using bayesian-gibbs sampling. *Osong Public Health Res Perspect*. 2015; **6**(2):100-5. PMID: 25938019 DOI: 10.1016/j.phrp.2015.01.004
4. Ghorbian S, Ardekani AM. Non-invasive detection of esophageal cancer using genetic changes in circulating cell-free DNA. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012;**4**(1):3-13. PMID: 23407878
5. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;**3**(6):415-28. PMID: 12042769 DOI: 10.1038/nrg816
6. Yu JX, Chao L, Ward DC, Chao J. Structure and chromosomal localization of the human prostatic (*PRSS8*) gene. *Genomics*. 1996;**32**(3):334-40. PMID: 8838796 DOI: 10.1006/geno.1996.0127
7. Yu JX, Chao L, Chao J. Prostatic is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *J Biol Chem*. 1994;**269**(29):18843-8. PMID: 8034638
8. Hooper JD, Bowen N, Marshall H, Cullen LM, Sood R, Daniels R, et al. Localization, expression and genomic structure of the gene encoding the human serine protease testisin. *Biochem Biophys Acta*. 2000;**1492**(1):63-71. PMID: 11004480
9. Sarojini S, Tamir A, Lim H, Li S, Zhang S, Goy A, et al. Early detection biomarkers for ovarian cancer. *J Oncol*. 2012; **2012**:709049. PMID: 23319948 DOI: 10.1155/2012/709049
10. Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Ikeda Y, Cho YM, Hayashi N, et al. Down-regulated expression of prostatic in high-grade or hormone-refractory human prostate cancers. *Prostate*. 2003;**54**(3):187-93. PMID: 12518323 DOI: 10.1002/pros.10178
11. Chen LM, Chai KX. Prostatic serine protease inhibits breast

و سطح تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS* را در سلول‌های طبیعی اپیتلیال پستانداران (NHMEC: Nomal Human Mammary Epithelial Cells) و تعدادی از رده‌های سلولی سرطانی پستان از جمله MCF-7 با قدرت تهاجمی کم، رده MDA-MB-453 فاقد قدرت متاستاز و رده‌های MDA-MB-231 و MDA-MB-435s با قدرت تهاجم و متاستاز زیاد مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که دمتیله‌شده ناحیه پروموتور ژن با مهار هیستون داستیلازها همراه می‌باشد که در نتیجه موجب افزایش مجدد در سطح mRNA ژن *PRSS* در رده‌های MDA-MB-231 و MDA-MB-435s می‌گردد. این نتایج حاکی از آن بودند که بیان ژن *PRSS* در سلول‌های سرطانی پستان با واسطه متیلاسیون DNA تنظیم می‌گردد و در عدم بیان *PRSS*، قدرت تهاجمی و متاستازی سرطان پستان افزایش می‌یابد [۱۱].

علاوه‌براین، چن و همکاران در مطالعه دیگری میزان تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن *PRSS* را در رده‌های سلولی DU-145 و PC-3 سرطان پروستات مورد ارزیابی قرار دادند و عنوان نمودند که در نتیجه متیلاسیون پروموتور، بیان ژن *PRSS* کاهش یافته و می‌تواند نقش مهمی در شکل‌گیری سرطان

12. cancer invasiveness and is transcriptionally regulated by promoter DNA methylation. *Int J Cancer*. 2002;**97**(3):323-9. PMID: 11774283
12. Chen LM, Verity NJ, Chai KX. Loss of prostatic (*PRSS8*) in human bladder transitional cell carcinoma cell lines is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT). *BMC Cancer*. 2009;**9**:377. PMID: 19849847 DOI: 10.1186/1471-2407-9-377
13. Sakashita K, Mimori K, Tanaka F, Tahara K, Inoue H, Sawada T, et al. Clinical significance of low expression of prostatic mRNA in human gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2008;**98**(7):559-64. PMID: 18932242 DOI: 10.1002/jso.21158
14. Bao Y, Wang Q, Guo Y, Chen Z, Li K, Yang Y, et al. *PRSS8* methylation and its significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;**7**(19):28540-55. PMID: 27081034 DOI: 10.18632/oncotarget.8677
15. Bedi U, Mishra VK, Wasilewski D, Scheel C, Johnsen SA. Epigenetic plasticity: a central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Oncotarget*. 2014; **5**(8):2016-29. PMID: 24840099 DOI: 10.18632/oncotarget.1875
16. Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, et al. The serine protease prostatic regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. *Nat Commun*. 2014;**5**:3428. PMID: 24614850 DOI: 10.1038/ncomms4428
17. Uchimura K, Kitamura K. Prostatic (*PRSS8*) as a new pathological factor. *Nihon Rinsho*. 2015;**73**(3):523-33. PMID: 25812384
18. Keppner A, Malsure S, Nobile A, Auberson M, Bonny O, Hummler E. Altered prostatic (CAP1/Prss8) expression favors inflammation and tissue remodeling in DSS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;**22**(12):2824-39. PMID: 27755216 DOI: 10.1097/MIB.0000000000000940
19. Dvojakovska S, Popovic-Monevska D, Grcic A, Pancevski G, Benedetti A, Popovski V, et al. Promotor hypermethylated genes: prospective diagnostic biomarkers in oral cancerogenesis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;**46**(10):1737-40. PMID: 30100382 DOI: 10.1016/j.jcms.2018.07.019
20. Bao Y, Li K, Guo Y, Wang Q, Li Z, Yang Y, et al. Tumor suppressor *PRSS8* targets Sphk1/S1P/Stat3/Akt signaling in

- colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;**7**(18):26780-92. PMID: [27050145](#) DOI: [10.18632/oncotarget.8511](#)
21. Yan BX, Ma JX, Zhang J, Guo Y, Mueller MD, Remick SC, et al. Prostatin may contribute to chemoresistance, repress cancer cells in ovarian cancer, and is involved in the signaling pathways of CASP/PAK2-p34/actin. *Cell Death Dis*. 2014;**5**:e995. PMID: [24434518](#) DOI: [10.1038/cddis.2013.523](#)
22. Zhang L, Jia G, Shi B, Ge G, Duan H, Yang Y. PRSS8 is Downregulated and suppresses tumour growth and metastases in hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2016;**40**(3-4):757-69. PMID: [27915333](#) DOI: [10.1159/000453136](#)
23. Keshamouni VG, Schiemann WP. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis: a method to the madness. *Future Oncol*. 2009;**5**(8):1109-11. PMID: [19852724](#) DOI: [10.2217/fon.09.87](#)
24. Chen LM, Zhang X, Chai KX. Regulation of prostatin expression and function in the prostate. *Prostate*. 2004;**59**(1):1-12. PMID: [14991861](#) DOI: [10.1002/pros.10346](#)