

# رابطه مقادیر فولات، ویتامین ب ۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما با هیپرمتیلاسیون ژن رتینوئیک اسید رسپتور- بتا ۲ وابسته به سن در مبتلایان به سرطان پستان

سعید پیروزپناه<sup>۱</sup>، فروغ اعظم طالبان<sup>۲</sup>، علیرضا ابدی<sup>۳</sup>، مرتضی عطری<sup>۴</sup>، پروین مهدی پور<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته دوره Ph.D، گروه تغذیه انسانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار، گروه تغذیه انسانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> دکترای تخصصی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش جراحی بیمارستان تخصصی دی، تهران، ایران

<sup>۵</sup> استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۰۸/۷؛ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۵

**مقدمه و اهداف:** بیان ژنی رتینوئیک اسید رسپتور- بتا ۲ (RARβ2) در سلول‌های تومور پستان اهمیت درمانی داشته و معمولاً به واسطه هیپرمتیلاسیون در بخش تنظیم کننده بیان ژن (پروموتور) می‌تواند مهار می‌گردد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی ارتباط مقادیر فولات، ویتامین ب ۱۲ و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 وابسته به سن در بیماران مبتلا به سرطان پستان بود. روش کار: این مطالعه در جامعه‌ای مشتمل بر ۱۲۶ بیمار مبتلا به سرطان پستان در سنین بین ۲۸ الی ۸۵ سال انجام شد. وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در بافت تومور با استفاده از روش Methylation-specific PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج: هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 در ۳۶/۵ درصد از بیماران مشاهده گردید. هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2 با سن در زمان تشخیص بیماری و تاریخچه فامیلی سرطان پستان ارتباط عکس نشان داد. در بیماران سنین ۴۸ سال به بالا، سطح فولات پلاسما در گروه متیله کمتر از گروه غیر متیله بود ( $P < 0/05$ ). در حالیکه در بیماران سنین ۴۸ سال به پایین، میزان هموسیستئین تام پلاسما در گروه متیله بیشتر از گروه غیر متیله بود ( $P < 0/05$ ). در سنین بالاتر از ۴۸ سال، ارتباط عکس و معنی‌دار بین سطوح فولات (OR=۰/۸۸۷-۰/۰۵۲ / ۹۵CI:۰/۰۹۵) و ویتامین ب ۱۲ پلاسما (OR=۰/۲۱۴) و وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ2 مشاهده شد. در همین گروه سنی، سطح بالای هموسیستئین پلاسما (OR=۲۵/۷-۱/۰۶۷ / ۹۵CI: ۷/۵۵) در افزایش شانس بروز هیپرمتیلاسیون RARβ2 نقش داشت.

**نتیجه‌گیری:** سطوح پایین فولات و ویتامین ب ۱۲ پلاسما و سطح بالای هموسیستئین پلاسما می‌توانند در پیش‌آگهی هیپرمتیلاسیون RARβ2 در مبتلایان به سرطان پستان نقش داشته باشند.

**واژگان کلیدی:** هیپرمتیلاسیون، سرطان پستان، رتینوئیک اسید رسپتور- بتا ۲، فولات، ویتامین ب ۱۲، هموسیستئین

## مقدمه

سرطان پستان بعد از سرطان معده علت اصلی میرایی ناشی از تومورهای بدخیم در بین زنان ایرانی به شمار می‌رود. شیوع سرطان پستان در بین زنان ایرانی در مقایسه با کشورهای غربی کمتر بوده، ولی تظاهرات بیماری شدیدتر و میانگین سن ابتلا پایین‌تر است (۱،۲). با توجه به شیوع روز افزون سرطان پستان در کشور (۱)، لزوم بررسی تداخل عوامل محیطی - ژنتیکی در تعریف

سرطان پستان بعد از سرطان معده علت اصلی میرایی ناشی از تومورهای بدخیم در بین زنان ایرانی به شمار می‌رود. شیوع سرطان پستان در بین زنان ایرانی در مقایسه با کشورهای غربی

چگونگی هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> وابسته به سن در بیماران مبتلا به سرطان پستان است.

## روش کار

### جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن مورد نظر در توده بافت ۱۳۷ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان (بدون سابقه سرطان دیگر) در سنین ۲۸ تا ۸۵ سال، که در سال‌های ۱۳۸۵ الی ۱۳۸۷ به بیمارستان مرجع دی در شهر تهران مراجعه نموده بودند (Consecutive case series) مورد بررسی قرار گرفت. حجم نمونه مورد بررسی با استفاده از آزمون مقایسه نسبت‌ها (اطمینان ۹۵٪ و توان آزمون ۸۰٪) و شواهد به دست آمده در گزارشات پیشین (۱۹)، ۳۱ نفر تخمین زده شد. مهم‌ترین معیارهای ورود به مطالعه تمایل به همکاری در پژوهش، اولین جراحی به واسطه ابتلا به سرطان پستان (بدون سابقه سرطان دیگر) و تایید بدخیمی تومور از نظر هیستوپاتولوژی بودند. نهایتاً ۱۲۶ نفر برای شرکت در بررسی مورد نظر مجاز شناخته شدند. با وجود محدودیت دسترسی به کلیه نمونه‌های پلازما، ارتباط سطح پلاسمایی متغیرهای مستقل با چگونگی هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> در ۱۰۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفت.

داده‌های مربوط به طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی (مجراحی<sup>۳</sup> و غیر مجراحی) (n=۸۹)، درجه بندی هیستوپاتولوژی (Grade: I, II, III) (n=۹۶)، اندازه تومور (۲ ≤، ۵-۲/۱ و >۵ سانتی متر) و وضعیت بیان ER<sup>۴</sup> (مثبت، منفی) (n=۹۲) با استفاده از ایمونوهیستوشیمی (IHC)<sup>۵</sup> از گزارش پاتولوژی تهیه شدند. از افراد مورد مطالعه در رابطه با عوامل دموگرافیک نظیر سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، سنین بلوغ، یائسگی و نخستین بارداری، تاریخچه فامیلی انواع سرطان (مثبت، منفی)، تاریخچه استعمال دخانیات و نوشیدنی‌های الکلی (مثبت، منفی و طول مدت) سؤال شد. بارداری، شیردهی، قاعدگی نامرتب، مصرف مزمن داروهای ضد تشنج، ضد بارداری، تاموکسیفن، رالوکسیفن، تیبولون، مکمل‌های هورمونی دیگر، متوتروکسات، سیکلوسپورین، تئوفیلین، متفرمین، (مثبت، منفی) مکمل‌های ویتامینی فولات و ب<sub>۱۲</sub> (مثبت، منفی)، در فاصله زمانی یک ماه پیش از تشخیص بیماری، تاریخچه بیماری التهابی (مثبت، منفی)، مدت مواجهه، سابقه سرطان

سبب شناسی بیماری احساس می‌شود. رتینوئیدها نظیر اسید رتینوئیک، قابلیت تنظیم تقسیم و نمو سلول و ویژگی القاء آپوپتوز را به واسطه فعالیت رسپتور هسته‌ای رتینوئیک اسید رسپتور- بتا (RARβ) در سلول‌های سرطان پستان بر عهده دارند. واکنش هیپرمتیلاسیون به عنوان فرایند موثر در کاهش و حتی مهار بیان ژنی بسیاری از ژن‌های سرکوب کننده تومور<sup>۱</sup> قلمداد می‌شود (۳-۶). واکنش هیپرمتیلاسیون بطور عمده در منطقه پروموتور ژن (جایگاه تنظیم ژن) و بر روی نوکلئوتید سیتوزین در توالی سیتوزین- گوانوزین<sup>۲</sup> رخ می‌دهد. بنابراین طی فرایند هیپرمتیلاسیون در برخی از ژن‌ها، بیان ژنی و بالطبع فعالیت ژن به‌طور مؤثر مهار می‌شود (۷، ۸). از ژن‌های سرکوب کننده تومور که در مسیر درمانی سرطان پستان اهمیت داشته و در نتیجه هیپرمتیلاسیون به طور چشمگیر دچار سکوت می‌شود می‌توان به ژن رتینوئیک اسید رسپتور-بتا<sup>۲</sup> (RARβ<sub>2</sub>) اشاره نمود. با وجود اینکه تحقیقات مختلفی در زمینه هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> در بافت‌های مختلف وجود دارد ولی تاکنون مطالعات بسیار محدودی مبنی بر نقش متغیرهای موثر بر روند متیلاسیون صورت گرفته است. بر پایه نتایج دیگر مطالعات تغییر در الگوی متیلاسیون DNA احتمالاً وابسته به تجمع عملکرد عوامل مختلف محیطی- فیزیولوژیکی در طی زمان است (۹، ۱۰). بنابراین ارتباط عوامل مستقل نظیر سن در زمان تشخیص بیماری، طول مدت مواجهه با استرادیول (طول دوران باروری)، سنین یائسگی، بلوغ و نخستین بارداری، با هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته است (۱۱-۱۲).

پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که اسید فولیک در تامین واحدهای تک کربنی S- آدنوزیل متیونین (SAM) و نهایتاً سوسترای اصلی متیلاسیون داخل سلولی نقش بسزایی دارد (۱۷-۱۳). با وجود این، تاکنون ارتباط سطوح فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلازما با هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. اخیراً شواهدی دال بر تاثیر احتمالی سن در ارتباط با وضعیت فولات روی تغییرات متیلاسیون عمومی DNA ژنومیک به دست آمده است (۱۸). ولی تاکنون این فرضیه در مورد تغییرات الگوی هیپرمتیلاسیون ژن‌ها به سبب عدم تعادل سطوح فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلازما در بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد توجه قرار نگرفته است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه، بررسی ارتباط سطح فولات، ویتامین ب<sub>۱۲</sub> و هموسیستئین تام پلازما با

<sup>۳</sup> Ductal

<sup>۴</sup> Estrogen Receptor

<sup>۵</sup> Immunohistochemistry

<sup>۱</sup> Tumor Suppressor Genes

<sup>۲</sup> CpG sites

جدول ۱- ارتباط بین سن در زمان تشخیص بیماری، مشخصات تومور و تاریخچه فامیلی بیماران مبتلا به سرطان پستان و وضعیت هیپرمیتیلایون RARβ2 (n=۱۳۷).

وضعیت هیپرمیتیلایون RARβ2			متغیرها	
P	متیله (n=۵۰)	غیر متیله (n=۸۷)		
سن در زمان تشخیص بیماری (سال)				
۰/۰۴۷	۲۸(۶۳/۶)	۳۷(۴۵/۱)	۴۸ <	
	۱۶(۳۶/۴)	۴۵(۵۴/۹)	≥ ۴۸	
درجه بندی هیستوپاتولوژی				
۰/۸۰۰	۴(۱۲/۱)	۸(۱۲/۷)	I	
	۱۱(۳۳/۳)	۲۵(۳۹/۷)	II	
	۱۸(۵۴/۶)	۳۰(۴۷/۶)	III	
وضعیت بیان استروژن رسپتور (IHC)				
۰/۷۹۵	۱۰(۳۴/۵)	۲۰(۳۱/۷)	منفی	
	۱۹(۶۵/۵)	۴۳(۶۸/۳)	مثبت	
طبقه بندی هیستوپاتولوژی				
۰/۷۹۵	۲۶(۸۱/۲)	۴۵(۷۸/۹)	مجربایی	
	۶(۱۸/۸)	۱۲(۲۱/۱)	غیر مجربایی	
تاریخچه فامیلی سرطان پستان				
۰/۰۳۳	۴۳(۹۱/۵)	۴۷(۷۵/۸)	منفی	
	۴(۸/۵)	۱۵(۲۴/۲)	مثبت	
تاریخچه فامیلی سرطان های دیگر				
۰/۱۱۲	۱۵(۴۴/۱)	۱۴(۲۶/۹)	منفی	
	۱۹(۵۵/۸)	۳۸(۷۳/۱)	مثبت	

n, تعداد افراد؛ داده های داخل پرانتز نمایانگر توزیع فراوانی نسبی هستند. آزمون Chi-square برای بررسی روند معنی داری ارزش P استفاده شد.

جدول ۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار متغیرهای مربوط به بیماران مبتلا به سرطان پستان در گروه با هیپرمیتیلایون RARβ2 در مقایسه با گروه غیر متیله (n=۱۰۰)

P	سن ≥ ۴۸ سال		P	سن < ۴۸ سال		
	متیله	غیر متیله		متیله	غیر متیله	
۰/۰۲۳	۸/۳±۳/۶	۱۱/۳±۴/۱	۰/۵۴۹	۹/۶±۳/۸	۱۰/۲±۳/۳*	فولات (ng/ml)
۰/۸۴۵	۳۷۲±۲۶۴	۳۹۲±۲۴۸	۰/۷۴۱	۴۳۱±۳۵۷	۴۰۵±۲۱۵	ویتامین ب۱۲ (pmol/l)
۰/۳۵۹	۸/۳±۳/۴	۷/۳±۳/۶	۰/۰۳۵	۸/۷±۳/۹	۶/۶±۲/۶	هموسیستئین (μmole/l)

برای بررسی مقادیر پلاسمايي فولات، ویتامین ب۱۲ و هموسیستئین، تعداد بیماران مورد مطالعه در دو گروه متیله و غیر متیله به ترتیب شامل ۳۴ و ۶۶ نفر هستند. \* داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

بیماران مورد بررسی در دسترس نبود. لذا برخی از یافته های توصیفی این مطالعه با حجم نمونه یکسان مورد تحلیل قرار نگرفته اند. از بیماران، رضایت نامه کتبی برای شرکت در پژوهش اخذ شد. در ضمن روش مطالعه توسط کمیته اخلاق انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور تایید گردید.

#### آزمایش های بیوشیمیایی

جهت سنجش مقادیر ویتامین ب۱۲ و فولات از روش Automated Electrochemiluminescence Immunoassay با

(مثبت، منفی)، سابقه دریافت شیمی درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی (مثبت، منفی)، هیپرتیروئیدیسم و سابقه جراحی پستان و تخمدان (مثبت، منفی) نیز مورد پرسش قرار گرفته و به عنوان معیار خروج از مطالعه تلقی گردیدند. با کسر تاریخ اولین قاعدگی از تاریخ یائسگی، طول مدت مواجهه با استرادیول (طول دوران باروری) که به عنوان عامل محرک تقسیم سلولی در پستان مطرح است (۲۰)، تخمین زده شد (به ازای ماه). گاهی برخی از داده های مربوط به مشخصات دموگرافیک و هیستوپاتولوژیک

جدول ۳- توزیع فراوانی، نسبت شانس تعدیل شده (OR) و ۹۵٪ فاصله اطمینان (۹۵CI) بروز هیپرمتیلاسیون RARβ2 در ارتباط با سطح فولات، ویتامین ب ۱۲ و هموسیستئین پلاسما بیماران مبتلا به سرطان پستان

سن $\geq 48$ سال			سن $< 48$ سال		
P	متیله	غیرمتیله	P	متیله	غیرمتیله
<b>فولات (ng/ml)</b>					
	$< 9/8$	$\geq 9/8$		$< 9/8$	$\geq 9/8$
۰/۰۶۶	۹(۶۴/۳)	۱۴(۳۵/۹)	۰/۷۶۱	۱۲(۶۰/۰)	۱۵(۵۵/۶)
	۵(۳۵/۷)	۲۵(۶۴/۱)		۸(۴۰/۰)	۱۲(۴۴/۴)
	۰/۳۱۱(۰/۰۸۷-۱/۱۱۲)			۰/۷۳۳(۰/۲۵۸-۲/۶۹۴)	
	۰/۲۱۴(۰/۰۵۲-۰/۸۸۷)			۱/۱۵(۰/۳۲-۴/۱۹)	
<b>ویتامین ب ۱۲ (pmol/l)</b>					
	$< 360$	$\geq 360$		$< 360$	$\geq 360$
۰/۹۳۴	۷(۵۰/۰)	۲۰(۵۱/۳)	۰/۶۴۲	۹(۴۵/۰)	۱۴(۵۱/۹)
	۷(۵۰/۰)	۱۹(۴۸/۷)		۱۱(۵۵/۰)	۱۳(۴۸/۱)
	۱/۰۵۳(۰/۳۱-۳/۵۷)			۱/۳۱۶(۰/۴۱۳-۴/۱۹۹)	
	۰/۰۳۹(۰/۰۰۲-۰/۹۱۹)			۲/۴۴(۰/۴۱۹-۱۴/۳)	
<b>هموسیستئین (μmole/l)</b>					
	$< 6/7$	$\geq 6/7$		$< 6/7$	$\geq 6/7$
۰/۴۸۰	۶(۴۲/۹)	۲۱(۵۳/۸)	۰/۴۲۱	۸(۴۰/۰)	۱۴(۵۱/۹)
	۸(۵۷/۱)	۱۸(۴۶/۲)		۱۲(۶۰/۰)	۱۳(۴۸/۱)
	۱/۵۵۶(۰/۴۵۴-۵/۳۳)			۱/۶۱۵(۰/۵۰۱-۵/۲۰۸)	
	۷/۵۵(۱/۰۶۷-۲۵/۷)			۲/۲۷۵(۰/۴۵۴-۱۱/۴۰)	

داده‌های داخل پاراتر نمایانگر توزیع فراوانی نسبی هستند. از آزمون Chi-square برای بررسی روند معنی‌داری P استفاده شده است. نسبت شانس و ۹۵٪ فاصله اطمینان به صورت OR (۹۵CI) نشان داده شده است.

در تخمین نسبت شانس از سطوح فولات، ویتامین ب ۱۲ و هموسیستئین پایین پلاسما به عنوان مقادیر مرجع استفاده شده است.

\* اثر متغیرهای سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، مصرف سیگار (مثبت، منفی) و درجه‌بندی هیستوپاتولوژی (II، III) و تعدیل شدند.

† اثر متغیرهای درجه‌بندی هیستوپاتولوژی (III، II، I)، شرایط یائسگی (مثبت، منفی)، مصرف سیگار (مثبت، منفی) و نمایه توده بدن در ۵ سال گذشته  $\leq 24/9$  -  $29/9$  -  $25$  و  $\geq 30$  هموسیستئین تام پلاسما  $< 6/7$ ،  $\geq 6/7$  (μmole/l) تعدیل شدند.

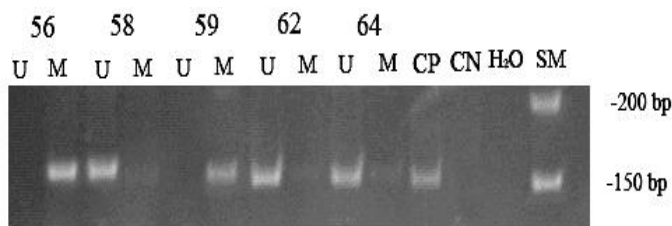
‡ اثر متغیرهای سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، درجه‌بندی هیستوپاتولوژی (II، III)، شرایط یائسگی (مثبت، منفی)، مصرف سیگار (مثبت، منفی) و ویتامین ب ۱۲ پلاسما  $< 360$ ،  $\geq 360$  (pmol/l) تعدیل شدند.

نظر هیستوپاتولوژی، با کمک فنل - کلروفورم استخراج شد. صحت DNA استخراج شده با کمک ژل آگارز ۱/۵٪ و خوانش جذب نوری در OD260 مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی وضعیت هیپرمتیلاسیون از واکنش بیسولفیت سدیم پیشنهادی توسط Herman و همکاران (۳) استفاده شد. در این روش سیتوزین غیر متیله در ژنوم با کمک بیسولفیت سدیم تبدیل به اوراسیل می‌گردد ولی سیتوزین متیله شده، بدون تغییر باقی خواهد ماند. بنابراین می‌توان با تنظیم پرایمرهای اختصاصی دو حالت متیله و غیر متیله و با استفاده از تکنیک (MSP Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction)، توالی DNA متیله در مقایسه با توالی غیرمتیله را تمیز داد. از اینرو جهت بررسی وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ2، از پرایمرهای تنظیم شده برای تولید قطعه ۱۴۶ bp شامل 5'-

کمک کیت‌های Roche Elecsys Folate II reagent kit (USA) و Roche Elecsys Vitamin B12 reagent kit (USA) مطابق دستورالعمل استفاده شد. میزان هموسیستئین در نمونه‌های مورد بررسی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، با دیتکتور فلورسنس اندازه‌گیری گردید. ۲۵ درصد از نمونه‌ها به منظور کنترل صحت بررسی، با کدهای متفاوت مورد آزمایش مجدد قرار گرفتند. در ضمن کارکنان آزمایشگاه از وضعیت نمونه‌ها آگاه نبودند. آزمایش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه تخصصی بیمارستان دی در شهر تهران انجام پذیرفت.

#### بررسی هیپرمتیلاسیون ژن

در زمان جراحی نمونه بافت در نیتروژن مایع ذخیره شد و بعد به فریزر ۷۰- سانتی‌گراد منتقل گردید. برای بررسی وضعیت متیلاسیون RARβ2، DNA، نمونه‌های بافتی بدخیم (تایید شده از



شکل ۱- آنالیز MSP بر روی پروموتور ژن RARβ2 در کارسینومای پستان (شماره نمونه: ۶۴-۵۶) نشان داده شده است. فراورده های PCR در خطوط M و U به ترتیب نشان دهنده باندهای هیپرمیتیل و غیر میتیل ژن RARβ2 هستند. کنترل مثبت (Positive control: CP) در هر دوره واکنش PCR همراه نمونه های دیگر تکرار شده و طرز تهیه این نوع نمونه با آنزیم SssI methylase در قسمت روش تحقیق مقاله ذکر شده است. DNA لئوسیت های فرد طبیعی که به واسطه واکنش با بیسولفیت سدیم تیمار شده است به عنوان کنترل منفی (Negative control: NC) در PCR استفاده شد. از آب دیونیزه به جای نمونه های DNA در هر دوره PCR برای آزمون احتمال آلودگی مواد آزمایشگاهی استفاده شد (H<sub>2</sub>O). اندازه طول فراورده های PCR با Marker size به ازای bp نشان داده شده است.

کنترل مثبت و ۸ مورد از نمونه ها با هیپرمیتیلایسیون در قطعه مورد بررسی (ی) از پرایمرهای 5' - AAGTAGTAGGAAGTGAGTTGTTAGA-3' (sense) و 5' - CCAAATTCTCCTTCAAATAA-3' (antisense) برای تولید فراورده ۲۰۷ bp استفاده شد (در برگزیده قطعه ۱۴۶ bp) و از آنزیم Tail (Maell) (Biolabs, CA) برای ایجاد برش در توالی میتیل شده ACGT بر روی ژن RARβ2 طبق روش Youssef و همکاران استفاده شد (۴). علاوه بر این بعد از استخراج DNA از باند مشاهده شده در ۲۰۷ bp (ژل پلی آکرلامید) از plasmid R/T540 TA Cloning vector (Fermentase) و miniprep kit (Fermentase) برای تخلیص و تکثیر توالی مورد نظر استفاده شد. نهایتاً بعد از اطمینان از حضور پلاسمیدهای حاوی قطعه مورد نظر با انجام PCR مجدد، توالی DNA پلاسمید با استفاده از دستگاه ABI automated DNA sequencer تعیین و تایید شد.

#### تجزیه و تحلیل داده های آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (Chicago, IL) انجام پذیرفت. آزمون کولموگروف- اسمیرنف برای تحلیل توزیع نرمال متغیرهای کمی پیوسته بکار رفت. آزمون t مستقل برای مقایسه داده های کمی پیوسته بین دو گروه بیماران با میتیلایسیون و بدون میتیلایسیون بکار گرفته شد. برای مقایسه سطح ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلاسما از آزمون ناپارامتری Mann-Whitney U بعد از تعدیل لگاریتمی استفاده شد. در ضمن از میان (median) داده های مربوط به سطح پلاسمایی فولات، ویتامین ب<sub>۱۲</sub> و هموسیستئین و سنین مورد بررسی برای طبقه بندی دوتایی

5'- TCGAGAACGCGAGCGATTCCG-3' (sense) و 5'- GACCAATCCAACCGAAACGA-3' (antisense) هستند، استفاده شد. برای بررسی قطعه غیر میتیل (۱۴۶bp)، پرایمرهای 5'- TTGAGAATGTGAGTGATTGA-3' (sense) و 5'- AACCAATCCAACCAAAACAA-3' (antisense) به کار رفت (۲۱). دمای annealing برای هر دو واکنش به ترتیب شامل ۵۹ و ۵۲ درجه سانتی گراد بود. ترکیب واکنش PCR شامل ۱× بافر PCR، ۱/۲۵ میلی مول dNTPs، ۲ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد از آنزیم Taq پلی مراز و ۱۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA تیمار شده با بیسولفیت سدیم در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. فراورده های PCR بر روی ژل پلی آکرلامید ۷٪ بارگذاری شده و نهایتاً بعد از رنگ آمیزی Ethidium bromide با تصویرساز UV باند اختصاصی مشاهده شد (شکل ۱). از DNA لئوسیت تیمار شده با بیسولفیت سدیم و نیز آب دیونیزه به عنوان کنترل های منفی در واکنش MSP با پرایمرهای اختصاصی میتیلایسیون استفاده شد. در ضمن از DNA لئوسیت تیمار شده با آنزیم SssI methyltransferase (New England Biolabs, MA) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای بررسی پایایی نتایج هیپرمیتیلایسیون، آزمایش در مورد کلیه نمونه ها ۲-۳ بار تکرار گردید. علاوه بر این در صورت مشاهده باند فراورده PCR ضعیف، مجدداً واکنش PCR تکرار می شد (۲-۱ بار). در تفسیر نتایج، وجود شرایط هتروژن میتیل و غیر میتیل برای نمونه ها نمایانگر حالت میتیل بود (شکل ۱).

در ضمن برای ارزیابی روایی داده های قطعه ۱۴۶ bp (نمونه

<sup>۱</sup> Polymerase Chain Reaction

وضعیت هیپرمتیلاسیون همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد، ولی هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> بیشتر در تومورهای نوع مجرای (۸۱/۲ درصد) مشاهده گردید.

با توجه به همبستگی موجود بین سن در زمان تشخیص بیماری و وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub>، دو گروه سنی بیشتر و کمتر از ۴۸ سال برای مقایسه میانگین مقادیر فولات، ویتامین ب<sub>۱۲</sub> و هموسیستئین تام پلاسما در حالات مختلف هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> مورد استفاده قرار گرفته و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. با بررسی میانگین سطح فولات پلاسمایی بیماران در سنین بالاتر از ۴۸ سال مشاهده شد که سطح فولات در گروه متیله بطور معنی‌دار کمتر از گروه غیرمتیله بود ( $P < 0/05$ ). سطح ویتامین ب<sub>۱۲</sub> تفاوت معنی‌دار بین دو گروه نشان نداد. مقدار هموسیستئین تام پلاسما در بین زنان سنین پایین‌تر از ۴۸ سال و در گروه متیله بطور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از گروه غیرمتیله بود ( $P < 0/05$ ).

در جدول ۳، مقادیر نسبت شانس (OR) و فاصله اطمینان ۹۵٪ در مورد ارتباط مقادیر فولات، ویتامین ب<sub>۱۲</sub> و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> در بیماران مبتلا به سرطان پستان در هر دو گروه سنی نشان داده شده است. در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال، سال هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> با مقادیر فولات پلاسما ارتباط عکس داشته و نسبت شانس تخمینی در حدود ۰/۲۱۴ ( $95\%CI: 0/052-0/887$ ) بود. در گروه سنی پایین‌تر از ۴۸ سال، بعد از تعدیل ارتباط عوامل مخدوش‌کننده، نقش فولات در ارتباط با وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> معنی‌دار نبود (جدول ۳). بین سطح ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلاسما و هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> ارتباط عکس وجود داشت ( $95\%CI: 0/002-0/919$ ). نسبت شانس ۷/۵۵ ( $95\%CI: 1/067-25/7$ ) ارتباط عکس مشاهده شد.

## بحث

توزیع فراوانی نسبی هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> در بخش قابل ملاحظه‌ای از تومورهای بدخیم پستان (۳۶/۵ درصد) مشاهده گردید. نتایج مطالعات پیشین در زنان مبتلا به سرطان پستان بر فراوانی نسبی هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> (در حدود ۴۲-۱۰ درصد) دلالت داشته‌اند (۲۴-۵۰۲۲). بنابراین همسو با نتایج پژوهش‌های صورت گرفته، توزیع فراوانی مشاهده شده در بیماران ایرانی نیز در

متغیرها استفاده شد. ارتباط و روند محتمل بین وضعیت متیلاسیون RARβ<sub>2</sub> با داده‌های مستقل گروه‌بندی شده با کمک مربع کای<sup>۷</sup> مورد تحلیل قرار گرفتند. آزمون رگرسیون لجستیک برای تعیین ارتباط فاکتورهای مستقل از میان فراسنج‌های بیوشیمیایی با وضعیت هیپرمتیلاسیون استفاده شد. بدین ترتیب تخمینی از نسبت شانس (Odd's Ratio) و فاصله اطمینان ۹۵٪ بدست آمد. البته اثر دیگر متغیرهای مستقل (با اثر مخدوش‌کننده) که با عوامل بیوشیمیایی و یا وضعیت هیپرمتیلاسیون ارتباط داشتند کنترل گردید. مقادیر ارزش P بصورت دو دامنه و کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌داری تلقی گردید.

## یافته‌ها

از ۱۳۷ نمونه تومور مورد بررسی، هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> در ۵۰ مورد (۳۶/۵٪) مشاهده شد. در دو مورد توده فیبروزیستیک، هیپرمتیلاسیون ژن RARβ<sub>2</sub> در وضعیت غیرمتیله قرار داشت. میانگین سن در زمان تشخیص بیماری ۹۱/۴ ± ۴۹/۶ سال بود. تومورهایی با مشخصه RARβ<sub>2</sub> متیله در مقایسه با گروه غیر متیله در سنین پایین‌تر دیده شدند (به ترتیب شامل ۴۸/۰ ± ۷/۷ در مقایسه با ۵۰/۴ ± ۱۰/۳ سال) که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P = 0/187$ ). میانگین سنین مربوط به اولین قاعدگی، یائسگی و نخستین بارداری بیماران، بین گروه متیله و گروه غیرمتیله تفاوت چشمگیری نداشت. بین مشخصه‌های طبقه‌بندی شده مربوط به این سنین با وضعیت هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> ارتباط معنی‌دار یافت نشد (نتایج نشان داده نشده است). طبق نتایج نشان داده شده در جدول ۱، توزیع فراوانی هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> در گروه سنی پایین‌تر از ۴۸ سال به طور معنی‌دار بیش از گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال بود ( $P < 0/05$ ). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> با تاریخچه فامیلی سرطان پستان ارتباط عکس دارد ( $n=86$ ) (جدول ۱). هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> در ۹۱/۵٪ از بیماران بدون تاریخچه فامیلی مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). تاریخچه فامیلی دیگر انواع سرطان با هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> ارتباط نداشت (جدول ۱). نتایج رنگ‌آمیزی IHC، از عدم بیان پروتئین ER در ۳۳ درصد از بیماران (۳۱/۹۳) حکایت می‌کرد. بین بیان پروتئین ER و هیپرمتیلاسیون RARβ<sub>2</sub> در تومور، ارتباط قوی یافت نشد ( $P = 0/795$ ). بین طبقه‌بندی و درجه‌بندی هیستوپاتولوژی و

<sup>۷</sup> Chi-square test

حاضر بر فراوانی معنی‌دار هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> در افراد سنین بالای ۴۸ سال با سطح پایین فولات پلاسما دلالت داشت. علاوه بر این ارتباط قوی و معکوس بین سطح فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلاسما با هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> در مبتلایان به سرطان پستان با سنین بالاتر از ۴۸ سال مشاهده شد، در حالیکه این ارتباط عکس در زنان جوان‌تر معنی‌دار نبود. بنابراین با جمع‌بندی شواهد بدست آمده می‌توان بر ارتباط سطح پایین فولات و حتی ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلاسما در روند بروز تغییرات متیلایسیون پروموتور ژن RARβ<sub>2</sub> به واسطه عامل گذر زمان تفسیر و تاکید نمود. به عبارت دیگر، نقش کمبود مزمن فولات و یا کوبالامین در سایه بررسی گذر زمان می‌تواند به عنوان عامل القا کننده غیر مستقیم متیلایسیون RARβ<sub>2</sub> جلوه نماید. همسو با نتایج بدست آمده از این مطالعه، یافته‌های van England و همکاران بر شیوع بالای متیلایسیون پروموتور ژن‌ها در بیماران مبتلا به CRC با دریافت فولات پایین در مقایسه با بیماران با دریافت کافی فولات اشاره دارد. برخلاف یافته‌های مطالعه ما، نتیجه پژوهش van England نه تنها اثر بالقوه سن را بررسی نکرده بود بلکه یافته‌های آن نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود (۱۶). به غیر از پژوهش حاضر تاکنون به ارتباط سطوح فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلاسما و وضعیت هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> با لحاظ تاثیر بالقوه سن اشاره‌ای نشده است. هر چند که بر اساس گزارش پیشین، کمبود ویتامین ب<sub>۱۲</sub> با خطر بروز سرطان پستان ارتباط عکس دارد (۱۳، ۱۵)، ولی تاکنون شواهدی مبنی بر همبستگی بین مقدار ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلاسمای بیماران و هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> گزارش نشده بود.

کمبود فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> از شاخص‌های مهم و تعیین کننده افزایش سطح هموسیستئین است (۸). نتایج مطالعات در شرایط *in vitro* و نمونه حیوانی نشان داده‌اند که S-آدنوزیل هموسیستئین (SAH) داخل سلولی می‌تواند آنزیم DNA methyltransferase (DNMT) را با پتانسیل بالا مهار سازد (۸). بنابراین تجمع SAH به واسطه کمبود مزمن فولات و یا ویتامین ب<sub>۱۲</sub> در سطح سلولی می‌تواند متیلایسیون DNA را مختل نماید (۱۰). به عبارت دیگر، فرض بر این است که اختلالات ممکن در الگوی متیلایسیون DNA که ناشی از عدم کفایت فولات است، احتمالاً بصورت هیپومیتیلایسیون عمومی DNA و یا هیپرمیتیلایسیون در جایگاه‌های تنظیم کننده فعالیت برخی از ژن‌های حیاتی تظاهر پیدا می‌کند (۱۰). با وجود این تاکنون مطالعه‌ای در مورد رابطه هموسیستئین تام با هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> انجام نشده بود. نتایج پژوهش حاضر در زنان جوان‌تر از ۴۸ سال نشان داد که

همین محدوده است. از نظر طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی، مطالعات گذشته نشان داده‌اند که پدیده هیپرمیتیلایسیون ژن RARβ<sub>2</sub> در تومورهای غیر از نوع مجرای بیشتر تظاهر پیدا می‌کند (۶، ۱۱). ولی در مطالعه حاضر برداشت معنی‌داری بدست نیامد. یافته‌های بدست آمده حاکی از ارتباط منفی بین تاریخچه فامیلی سرطان و هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> بود. Bean و همکاران (۷) نشان دادند که هیپرمیتیلایسیون ژن BRCA<sup>۱</sup> با بروز سرطان پستان فامیلی ارتباط ندارد. مطابق با نتایج بررسی حاضر، یافته‌های پژوهش دیگر بر روی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان نشان داد که میزان بروز متیلایسیون BRCA<sup>1</sup> در افراد با تاریخچه فامیلی منفی سرطان، بیشتر است؛ در حالیکه در مبتلایان به CRC، ارتباط مثبت بین تاریخچه فامیلی سرطان با هیپرمیتیلایسیون برخی از ژن‌ها گزارش شده است (۲۵، ۲۶). با وجود داده‌های متناقض، تا بحال وابستگی منفی هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> در رابطه با وراثت سرطان گزارش نشده بود. بنابراین شواهد موجود می‌تواند بر رویکرد متفاوت تاریخچه فامیلی بر روی متیلایسیون بر حسب نوع بافت و ژن دلالت داشته باشد. به علاوه، چنین همبستگی منفی بین احتمال اثر وراثت و متیلایسیون می‌تواند نقش سببی عوامل محیطی را بیشتر روشن نماید.

برخلاف جهش ژنتیکی<sup>۹</sup> که پدیده‌ای غیر قابل برگشت است، وضعیت هیپرمیتیلایسیون ژن‌ها بطور برگشت‌پذیر توسط عوامل محیطی قابل تغییر و تعدیل هستند (۱۲). سن که معرف تجمع اختلالات متیلایسیون در گذر زمان است، ظاهراً بر حسب نوع بافت و ژن بر الگوی متیلایسیون ژن‌ها تاثیر اختصاصی می‌گذارد (۷، ۲۸، ۲۷). برخلاف یافته بررسی حاضر مبنی بر همبستگی منفی بین سن و وضعیت هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub>، نتایج مطالعه دیگر در سرطان پستان از عدم وجود ارتباط بین وضعیت هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> و سن در زمان تشخیص بیماری حکایت می‌کنند (۷). در بیماری CRC مشاهده شده است که ویژگی هیپرمیتیلایسیون RARβ<sub>2</sub> وابسته به سن است (۴). از تفاسیر ممکن توسط Shelnutt و همکاران (۱۸) بر می‌آید که تاثیر افزایش سن در پیدایش متیلایسیون DNA (در بیماران مبتلا به CRC) می‌تواند در ارتباط با عدم کفایت دریافت فولات باشد. به عبارت دیگر در سنین بالا، احتمال مواجهه با تکرر عدم تعادل در دریافت عوامل تغذیه‌ای موثر در متیلایسیون نظیر فولات و یا ویتامین ب<sub>۱۲</sub> بیشتر بنظر می‌رسد (۱۲). همسو با گزارش Shelnutt، یافته‌های مطالعه

<sup>۸</sup> Breast Cancer-Associated Gene 1

<sup>۹</sup> Mutation

## نتیجه گیری

هیپرمتیلاسیون RAR $\beta$ 2 به نسبت قابل ملاحظه‌ای در بیماران مبتلا به سرطان پستان مشهود بود. تاریخچه فامیلی سرطان پستان و سن در زمان تشخیص بیماری با هیپرمتیلاسیون RAR $\beta$ 2 ارتباط عکس نشان دادند. با توجه به نقش فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> در متابولیسم عوامل متیلی، ارتباط عکس بین هیپرمتیلاسیون RAR $\beta$ 2 و مقادیر فولات و ویتامین ب<sub>۱۲</sub> پلازما در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال نشان داده شد. سطح هموسیستئین پلازما نیز در بیماران گروه متیله در مقایسه با گروه غیر متیله بالاتر بود و ارتباط بالقوه و مثبت با هیپرمتیلاسیون RAR $\beta$ 2 در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال ارائه نمود. در نتیجه درک تداخل ممکن بین عوامل موثر در سطح SAM سلولی و الگوی متیلاسیون DNA (به خصوص ژن‌های مؤثر در روند درمان) در قالب کنترل اثر بالقوه سن می‌تواند در هدایت به سوی مطالعات گسترده‌تر در بیماران مبتلا به سرطان پستان موثر واقع گردد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان محترم انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور برای تامین تسهیلات اعتباری این پژوهش، همکاران بیمارستان تخصصی دی و بیماران سپاسگزاری نموده و در ضمن یافته‌های منعکس شده در این نوشتار از داده‌های پایان نامه دوره دکترا است.

سطح هموسیستئین بیماران در گروه متیله بطور معنی‌دار بیش از بیماران گروه غیرمتیله بود. علاوه بر این، در گروه سنی بالاتر از ۴۸ سال، هیپرمتیلاسیون RAR $\beta$ 2 با مقادیر بالای هموسیستئین تام بعد از کنترل اثر متغیرهای بالقوه دیگر ارتباط مستقیم داشت. با وجود اینکه Friso و همکاران بر نقش هموسیستئین در هیپرمتیلاسیون DNA اتفاق نظر دارند (۲۹،۳۰)، ولی شواهدی دقیق مبنی بر ارتباط سطح هموسیستئین تام با هیپرمتیلاسیون ژن‌های دیگر در مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار نادر و متناقض بوده و بیشتر در بافت CRC مطرح شده‌اند. حال از یافته‌های بدست آمده چنین برداشت می‌شود که میزان هموسیستئین به عنوان شاخص حساس کمبود مژمن فولات (۸)، هیپرمتیلاسیون RAR $\beta$ 2 را در سنین بالا تحت تاثیر قرار می‌دهد. به عبارت دیگر، هموسیستئین تام پلازما می‌تواند در پیش آگهی نسبت SAM به SAH در سطح سلولی مطرح باشد. در نتیجه، افزایش هموسیستئین پلازما نه تنها می‌تواند گویای کمبود مژمن فولات و مهار آنزیم متیله کننده DNA (هیپرمتیلاسیون عمومی DNA) باشد (۲۹)، بلکه حتی توانایی القا هیپرمتیلاسیون به طور بالقوه در سنین بالا را بر عهده دارد. احتمالاً در محیط بیولوژیک، برای جبران و برطرف کردن مهار موجود به سبب افزایش هموسیستئین، بیان ژنتیکی آنزیم DNMT ارتقا پیدا کرده (۱۷) و سرانجام بعد از هیپرمتیلاسیون DNA در برخی از جایگاه‌های تنظیم‌کننده بیان ژن‌های سرکوب کننده تومور همانند RAR $\beta$ 2، متیلاسیون نابجا (هیپرمتیلاسیون) تظاهر پیدا می‌کند.

## منابع

- Akbari M. Iran Cancer Report. Cancer Research Center. Shahid Beheshti University(MC). 1st ed. 2008. 135-77.
- Atri M, Jafarimojarad E, Javidroozi M, and Mehdi pour P. Lack of association between early onset of breast cancer and numbers of affected relatives in an Iranian population. *Familal Cancer* 2003; 2: 117-8.
- Herman J, Graff J, Myhanen S, Nelkin B, and Baylin S. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93: 9821-6.
- Youssef E, Lotan D, Isaa J, Wakasa K, Fan Y, Mao L, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor  $\beta$ 2 gene in head and neck carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 1733-42.
- Fackler M, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in situ and invasive lobular breast carcinoma. *International Journal of Cancer* 2003; 107: 970-5.
- Bae Y, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler M, Sukumar S, et al. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 5998-6005.
- Bean G, Ibarra C, Drendall C, Goldenberg V, Baker J, Troch M, et al. Hypermethylation of the breast cancer-associated gene 1 promoter does not predict cytologic atypia or correlate with surrogate end points of breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2007; 16: 50-6.
- Kim Y. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2004; 13: 511-9.
- Euhus D, Bu D, Milchgrub S, Xie X, Bian A, Leitch A, et al. DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2008; 17: 1051-9.
- Johnson I and Belshaw N. Environment, diet and CpG island methylation: Epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 1346-59.
- Li S, Rong M, and Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Letters* 2006; 237: 272-80.
- Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 2007; 22: 91-103.



13. Zhang S, Willett W, Selhub J, Hunter D, Giovannucci E, Holmes M, et al. Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocysteine, and Risk of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95: 373-80.
14. Kim Y. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? *Nutrition Review* 2006; 1: 468-75.
15. Zhang SM, Hankinson SE, Hunter DJ, Giovannucci EL, Willett WC. Folate Intake and Risk of Breast Cancer Characterized by Hormone Receptor Status. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005; 14: 2004-8.
16. van Engeland M, Weijnenberg M, and Roemen GM ea. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3133-7.
17. Sohn K, Stempak J, Reid S, Shirwadkar S, Mason J, and Kim Y. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon. *Carcinogenesis* 2003; 24 81-90.
18. Shelnut K, Kauwell G, Gregory J, Maneval D, Quinlivan E, Theriaque D, et al. Methyltetrahydrofolate reductase 677C-T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004; 15: 544-60.
19. van Engeland M, Weijnenberg M, Roemen GM, Brink M, de Bruine A, Goldbohm R, et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Cancer Research* 2003; 63: 3133 – 7.
20. Nkhata K, Ray A, Dogan S, Grande J, and Cleary M. Mammary tumor development from T47-D human breast cancer cells in obese ovariectomized mice with and without estradiol supplements. *Breast Cancer Research and Treatments* 2008.
21. Cote S, Sinnott D, and Momparler R. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 743-50.
22. Yang Q, Sakurai T, Yoshimura G, Mori I, Nakamura M, Nakamura Y, et al. Hypermethylation does not account for the frequent loss of the retinoic acid receptor beta2 in breast carcinoma. *Anticancer Research* 2001; 21: 1829-33.
23. Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta S, Rathan R. Detection of RASSF1A and RARb hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. *Epigenetics* 2006; 1: 88-93.
24. Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller H, Amberger A, Zeschnigk M, et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 29: 826-32.
25. Chan A, Issa J, Morris J, Hamilton S, and Rashid A. Concordant CpG islands methylation in hyperplastic polyposis. *American Journal of Pathology* 2002; 160: 529-36.
26. Baldwin R, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Research* 2000; 60: 5329-33.
27. Issa J. CpG-island methylation in aging and cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2000; 249: 101-18.
28. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Research Review* 2003; 2: 245-61.
29. Friso S, Choi W, Girelli D, Mason J, Dolnikowski G, Bagley P, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2002; 99: 5606-11.
30. Friso S, Lamon-Fava S, Jang H, Schaefer E, Corrocher R, and Choi S. Oestrogen replacement therapy reduces total plasma homocysteine and enhances genomic DNA methylation in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition* 2007; 97: 617-21.

1.