

رابطه مقادیر پلاسمایی فولات، کوبالامین و هموسیستئین تام پلاسما با هیپرمتیلاسیون ژن گیرنده استروژن-آلفا در مبتلایان به سرطان پستان

سعید پیروزپناه^۱، فروغ اعظم طالبان^۲، مرتضی عطری^۳، علیرضا ابدی^۴، پروین مهدیپور^۵

- ۱- دانش‌آموخته دکترای علوم تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۲- نویسنده مسئول: استاد گروه تغذیه انسانی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: talebanfa@yahoo.de
- ۳- دکترای تخصصی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش جراحی، بیمارستان تخصصی دی
- ۴- استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۵- استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پست الکترونیکی: mehdiapor@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: بیان ژنتیکی گیرنده استروژن-آلفا (*Estrogen receptor-α, ERα*) در سلول‌های تومور پستان اهمیت درمانی دارد و بیان این ژن می‌تواند به واسطه هیپرمتیلاسیون در افزون ۱ مهار شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی ارتباط بین مقادیر فولات، ویتامین B₁₂ و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون *ERα* در مبتلایان به سرطان پستان برای اولین بار بود.

مواد و روش‌ها: جامعه مورد بررسی ۱۳۷ بیمار مبتلا به سرطان پستان در سنین بین ۲۸ تا ۸۵ سال بود. مقادیر پلاسمایی فولات و کوبالامین توسط دستگاه کمیلومینسنس خودکار و هموسیستئین تام پلاسما به وسیله HPLC اندازه‌گیری شد. وضعیت هیپرمتیلاسیون *ERα* در بافت تومور با استفاده از روش Methylation-specific PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیز داده‌ها، از رگرسیون لجیستیک با تعدیل اثر عوامل مخدوش کننده ممکن استفاده شد.

یافته‌ها: هیپرمتیلاسیون *ERα* در ۵۱/۱ درصد از بیماران مشاهده شد. هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* با تاریخچه مصرف سیگار، طول مدت باروری، به طور مستقیم و با بیان پروتئین ER ارتباط معکوس نشان داد. بعد از تعدیل اثر عوامل مخدوش کننده، بین سطح فولات ($OR=0/1185$ و $95CI$ ، $0/036-0/953$) و ویتامین B₁₂ پلاسما ($OR=0/1187$ و $95CI$ ، $0/052-0/668$) ارتباط معکوس یافت شد. افزون بر این، همبستگی قابل توجهی بین مقدار هموسیستئین تام پلاسما و خطر پیشرفت هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* مشاهده شد ($OR=9/61$ و CI $1/26-73/2$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این بررسی اثر بالقوه سطح هموسیستئین پلاسما و معکوس فولات و ویتامین B₁₂ پلاسما بر وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* در بیماران مبتلا به سرطان پستان را نشان داد.

واژگان کلیدی: ژن گیرنده استروژن-آلفا، هیپرمتیلاسیون، سرطان پستان، فولات، هموسیستئین

• مقدمه

جوامع غربی، سن بروز بیماری در زنان ایرانی، پایین‌تر و با تظاهرات بالینی شدیدتری همراه است (نظیر عدم بیان ژن گیرنده استروژن) (۱، ۲). سرطان پستان جزء تومورهای بدخیم وابسته به هورمون طبقه بندی می‌شود و هورمون استروژن تحت تاثیر گیرنده استروژن ER (Estrogen receptor) می‌تواند به افزایش تقسیم سلولی

بر پایه گزارش‌های نوین از کشورهای گوناگون، سرطان بعد از حوادث و بیماری‌های قلبی عروقی، بیشترین درصد مرگ و میر را به خود اختصاص می‌دهد. در ایران، شیوع سرطان پستان در مقایسه با کشورهای غربی کمتر است، ولی دومین عامل مرگ و میر ناشی از تومورهای بدخیم، بعد از سرطان معده است. در مقایسه با

اسید فولیک در تامین واحدهای تک کربنی برای سنتز SAM (S- آدنوزیل متیونین) و سرانجام، سوبسترای اصلی متیلاسیون داخل سلولی نقش به سزایی دارد (۱۳، ۱۲، ۶). کمبود حاد اسید فولیک، احتمالاً با کاهش متیلاسیون عمومی DNA و افزایش خطر بروز هیپرمیتلاسیون در برخی از جایگاه‌های تنظیم کننده بیان ژن‌های سرکوبگر تومور همراه است. نقطه تلاقی و تأثیر شدید این دو پدیده می‌تواند به صورت نئوپلاسم ظاهر یابد (۶).

مطالعات اپیدمیولوژیک در جوامع گوناگون همگی بر کاهش بروز انواع سرطان در اثر افزایش مصرف میوه و سبزی (منابع غذایی اسید فولیک) و منابع غذایی ویتامین B₁₂ هم عقیده هستند، ولی بیشتر این یافته‌ها به سرطان کولورکتال محدود می‌شود (۱۴). هم چنین، شواهدی مبنی بر ارتباط سطح اسید فولیک و کوبالامین پلاسم با وضعیت هیپرمیتلاسیون ژن *ERα* در کارسینومای پستان وجود ندارد. با توجه به شیوع روزافزون سرطان پستان، ضرورت نیاز به بررسی رابطه عوامل تأمین کننده گروه متیلی با تغییرات مولکولی در تومور سرطان پستان احساس می‌شد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی ارتباط مقادیر فولات، ویتامین B₁₂ و هموسیستئین تام پلاسم با وضعیت هیپرمیتلاسیون ژن *ERα* در بیماران مبتلا به سرطان پستان بود.

• مواد و روش‌ها

جامعه مورد مطالعه: در این مطالعه مقطعی ۱۳۷ بیمار زن مبتلا به سرطان پستان (بدون سابقه سرطان‌های دیگر) در سنین ۲۸ تا ۸۵ سال که در سال‌های ۱۳۸۵ الی ۱۳۸۷ به بیمارستان "دی" در شهر تهران مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. معیارهای ورود به مطالعه، تمایل به همکاری در پژوهش، اولین جراحی به واسطه ابتلا به سرطان پستان (بدون سابقه سرطان‌های دیگر) و تأیید بدخیمی از نظر هیستوپاتولوژی بود. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: تکمیل نکردن پرسشنامه، بارداری، شیردهی، قاعدگی نامرتب، مصرف مزمن الکل یا دخانیات (بیشتر از ۴۸ ماه)، مصرف داروهای مانع تاموکسیفن، رالوکسیفن، تیبولون،

توده بدخیم منجر شود. در این راستا از داروهایی با نقش آنتاگونیستی جهت کنترل عملکرد ER نظیر تاموکسیفن (Tamoxifen) استفاده می‌شود. عدم بیان پروتئین ER به این معناست که رشد سلول‌های سرطانی که تحت تأثیر استروژن هستند، دیگر قابلیت کنترل به واسطه هورمون درمانی را نخواهند داشت (مقاومت به داروی تاموکسیفن). این پدیده به تهاجمی‌تر شدن تومور با پیش‌آگهی بدتر منجر خواهد شد. بنابراین، با توجه به اهمیت ژن گیرنده استروژن-آلفا (*Estrogen receptor-α, ERα*) در رونویسی ژنتیکی ER، هرگونه مهار در بیان ژنتیکی این ژن می‌تواند بیماران را از دریافت درمان هورمونی با عوارض جانبی بسیار کمتر، محروم سازد (۳).

در سلول‌های پستانداران، واکنش هیپرمیتلاسیون یکی از فرایندهای موثر در کاهش و حتی عدم بیان ژنتیکی بسیاری از ژن‌ها به شمار می‌رود (۴). این تغییر، قابل برگشت است و معمولاً روی نوکلئوتید سیتوزین در توالی سیتوزین-گوانوزین (CpG sites) در جایگاه تنظیم ژن (پروموتور) رخ می‌دهد (۵، ۶). یافته‌های اکثر مطالعات بر عدم بیان ژنتیکی پروتئین ER در توده سرطان پستان، در اثر هیپرمیتلاسیون ژن *ERα* تأکید دارند (۷). با اینکه تحقیقات مختلفی در زمینه فراوانی انواع ژن‌هایی که در بافت‌های مختلف تحت تأثیر هیپرمیتلاسیون قرار می‌گیرند وجود دارد، ولی تاکنون مطالعات بسیار محدودی در زمینه عوامل محیطی با روند متیلاسیون ژن‌ها صورت گرفته است (۸).

تاریخچه فامیلی سرطان به عنوان یکی از عوامل پیش زمینه در تومورزایی اهمیت زیادی دارد. با وجود این، پژوهش‌های اندکی بر نقش تاریخچه فامیلی در انتقال الگوی متیلاسیون به نسل‌های بعدی اشاره نموده‌اند (۸-۱۰). تغییر در الگوی متیلاسیون DNA به تجمع و عملکرد عوامل مختلف محیطی- فیزیولوژیکی در طول زمان وابسته است. بنابراین، سن در زمان تشخیص بیماری، طول مدت مواجهه با استرادیول اندوزن (طول دوران باروری)، سن بلوغ، نخستین بارداری و یائسگی در رابطه با متیلاسیون ژن *ERα* مورد توجه قرار گرفته اند (۸، ۹، ۱۱). بررسی‌های متعددی نشان داده‌اند که

مکمل‌های هورمونی دیگر، متوتروکسات، سیکلوزپورین، تتوفیلین، ضدتشنج، ضدبارداری، فولات و ویتامین B₁₂ به مدت طولانی (در فاصله زمانی ۱۲ تا ۱۸ ماه گذشته) و ابتلا به بیماری کلیوی، انواع خوش خیم توده پستانی، هیپرتیروئیدیسم، سابقه شیمی درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی.

داده‌های برگرفته از گزارش پاتولوژی عبارت بودند از: طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی (Ductal و Non-ductal)، درجه بندی هیستوپاتولوژی (Grade I, II, III)، اندازه تومور (۲، ۵-۲/۱ و ۵ سانتی‌متر) و وضعیت بیان ER (Imunohistocemistry, IHC). از افراد مورد مطالعه در رابطه با عوامل دموگرافیک نظیر سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، سن بلوغ، یائسگی و نخستین بارداری، تاریخچه فامیلی انواع سرطان (مثبت، منفی)، تاریخچه بیماری (نوع؛ مثبت، منفی) و جراحی (نوع؛ مثبت، منفی) سؤال شد. برای شرکت در پژوهش از بیماران، رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. در ضمن، رعایت اخلاق در پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق انستیتو و دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی تأیید شده بود.

آزمایش‌های بیوشیمیایی: از ۱۰۱ بیمار بعد از ۱۴ ساعت ناشتا بودن، قبل از جراحی، به مقدار ۸cc خون گرفته شد و در لوله‌های آغشته به ۷/۵٪ K₃-EDTA ریخته شد. پلاسما بعد از سانتریفیوژ تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی به فریزر ۷۰°C منتقل شد. برای سنجش مقادیر پلاسمایی کوبالامین و فولات از روش Automated Electrochemiluminescence Immunoassay با کمک کیت‌های Roche Elecsys Folate II reagent kit و Roche Elecsys Vitamin B₁₂ reagent kit (USA) استفاده شد. میزان هموسیستئین در نمونه‌های مورد بررسی توسط HPLC با آشکارساز فلورسنس اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از درستی بررسی، ۲۵٪ نمونه‌ها با کدهای متفاوت دوباره مورد آزمایش قرار گرفتند. در ضمن، کارکنان آزمایشگاه از وضعیت نمونه‌ها آگاه نبودند. آزمایش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه تخصصی بیمارستان دی تهران انجام شد.

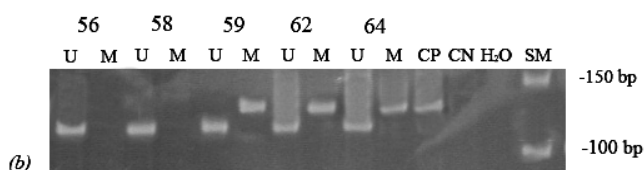
بررسی هیپرمتیلاسیون ژن: در زمان جراحی، نمونه بافت در نیتروژن مایع ذخیره شد و بعد به فریزر ۷۰°C منتقل شد و سپس DNA با کمک فنل-کلروفرم استخراج شد. صحت DNA استخراج شده با کمک ژل آگارز ۱/۵٪ و خوانش جذب نوری در OD₂₆₀ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی وضعیت متیلاسیون از واکنش بی‌سولفیت سدیم، پیشنهاد شده توسط Herman و همکاران (۴) استفاده شد. در این روش، سیتوزین غیرمتیله در ژنوم با کمک بی‌سولفیت سدیم به اوراسیل تبدیل می‌شود، ولی سیتوزین از قبل متیله شده، بدون تغییر باقی می‌ماند. بنابراین، با تنظیم پرایمرهای اختصاصی دو حالت متیله و غیرمتیله و با استفاده از تکنیک (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) متیله در مقایسه با توالی غیرمتیله تمیز داده می‌شود. از این رو جهت بررسی وضعیت متیلاسیون ژن *ERA*، از پرایمرهای تنظیم شده برای تولید قطعه ۱۳۰ bp در اگزون ۱ ژن *ERA* استفاده شد که شامل

5'-GGATATGGTTTGTATTTGTTTGT-3' (Sense)
5'-ACAAACAATTCAAAAACCTCCAAC-3' (Antisense)
است. برای بررسی قطعه غیرمتیله (۱۲۰bp) از پرایمرهای 5'-GATACGGTTTGTATTTGTTCGC-3' (Sense) و 5'-CGAACGATTCAAAAACCTCCAAC-3' (Antisense) استفاده شد (۷). دمای Annealing برای هر دو واکنش ۵۷°C بود. ترکیب واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) شامل بافر PCR، ۲۵ میلی مولار dNTPs، ۲ میلی مولار MgCl₂، پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد از آنزیم Taq پلیمرز و ۱۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA تیمار شده با بی‌سولفیت سدیم در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. فرآورده‌های PCR به میزان ۲۰ میکرولیتر روی ژل پلی آکرلامید ۹٪ بارگذاری شد و سرانجام بعد از رنگ آمیزی Ethidium Bromide با تصویرساز UV باند اختصاصی مشاهده شد (شکل ۱). از DNA لئوسیت تیمار شده با بی‌سولفیت سدیم و آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی همراه با پرایمرهای اختصاصی متیلاسیون استفاده شد. در

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 انجام گرفت. داده‌های کمی پیوسته به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده است. برای تحلیل توزیع نرمال متغیرهای کمی پیوسته آزمون کولموگروف-اسمیرنوف به کار رفت. برای مقایسه داده‌های کمی پیوسته بین دو گروه دارای متیلاسیون و بدون متیلاسیون آزمون Independent-Sample T-Test به کار گرفته شد. برای مقایسه سطح ویتامین B₁₂ پلاسمای از آزمون Independent-Sample T-Test بعد از تعدیل لگاریتمی استفاده شد. در ضمن، با استفاده از میانه، سطح پلاسمایی فولات، ویتامین B₁₂ و هموسیستئین و سنین مورد بررسی، دوتایی تقسیم بندی شد. ارتباط و روند محتمل بین وضعیت متیلاسیون ژن *ERα* با داده‌های مستقل طبقه بندی شده با کمک مجذور کای (Chi-square test) مورد تحلیل قرار گرفت. اثر فراوانی مورد انتظار در ۲۰٪ از خانه‌های جدول، کمتر از ۵ بود، از آزمون فیشر استفاده شد. آنالیز رگرسیون لجیستیک برای تعیین ارتباط داده‌های مستقل با وضعیت متیلاسیون به کار رفت. اثر عوامل مخدوش کننده در حالت ۱ (مدل I) نظیر سن در زمان تشخیص (کمی پیوسته)، اندازه تومور (≤ 2)، ۵-۲/۱ و > 5 سانتی متر) و درجه بندی هیستوپاتولوژی (I، II و III) و در حالت ۲ (مدل II) تاریخچه فامیلی سرطان پستان (مثبت، منفی)، مصرف سیگار (مثبت، منفی)، وضعیت یائسگی (مثبت، منفی)، طول مدت مواجهه با استرادیول (ماه)، مواجهه با اشعه X در عکسبرداری رادیولوژی (داده کمی گسسته)، همراه با متغیرهای حالت ۱ کنترل شدند (در صورت داشتن ارتباط قوی با متغیر وابسته و مستقل طبقه بندی شده). بدین ترتیب تخمینی از نسبت شانس (Odd's Ratio) در فاصله اطمینان ۹۵٪ بدست آمد. کلیه مقادیر ارزش P به صورت دو دامنه و کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی داری تلقی شد.

ضمن از DNA لنفوسیت متیله شده با آنزیم *SssI methyltransferase* (New England Biolabs, MA) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای بررسی پایایی نتایج هیپرمتیلاسیون، آزمایش در مورد کلیه نمونه‌ها ۲ تا ۳ بار تکرار شد. علاوه بر این، در صورت مشاهده باند ضعیف از فرآورده PCR، واکنش PCR ۱ تا ۲ بار تکرار شد.

در تفسیر نتایج، وجود شرایط هتروژن متیله و غیرمتیله برای نمونه‌ها نمایانگر حالت متیله بود (شکل ۱). برای تأیید روایی داده‌ها از آنزیم *SacII* (*Cfr42I*) و برای ایجاد برش در توالی GCGG روی قطعات متیله شده ژن *ERα* طبق روش *Lapidus* و همکاران عمل شد (۷). علاوه بر این، بعد از استخراج DNA از باند مشاهده شده در ۱۳۰ bp (ژل پلی آکرلامید) برای تخلیص توالی مورد نظر از Cloned into a R/T540 TA Cloning vector Plasmid miniprep kit (Fermentase, Germany) استفاده شد. سرانجام، حضور پلاسمیدهای حاوی قطعه مورد نظر با انجام PCR دوباره تأیید شد. از پلاسمیدها برای تعیین توالی (دستگاه ABI automated DNA sequencer) کمک گرفته شد و به این ترتیب باندهای به دست آمده تأیید شد. آزمایش‌های ژنتیکی در آزمایشگاه ژنتیک سرطان و سیتوژنتیک در گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.



شکل ۱- آنالیز MSP در آگزون ۱ ژن *ERα* در کارسینومای پستان

آنالیز MSP در آگزون ۱ ژن *ERα* در کارسینومای پستان (شماره نمونه: ۶۴-۵۶) نشان داده شده است. فرآورده‌های PCR در خطوط U و M به ترتیب نشان دهنده باندهای هیپرمتیله و غیرمتیله ژن *ERα* هستند. کنترل مثبت Positive Control (CP) نمونه تیمار شده با آنزیم *SssI* methylase DNA لنفوسیت‌های فرد طبیعی که به واسطه واکنش با بیسولفیت سدیم تیمار شده است به عنوان کنترل منفی (Negative Control) NC در PCR استفاده شد. برای آزمون احتمال آلودگی مواد آزمایشگاهی از آب دیونیزه به جای نمونه‌های DNA در هر دوره PCR به کار رفت (H₂O). اندازه طول فرآورده‌های PCR با marker size به ازای bp نشان داده شده است. وجود شرایط هتروژن متیله و غیرمتیله برای نمونه‌ها نمایانگر حالت متیله است (نمونه‌های ۵۹، ۶۲ و ۶۴).

• یافته‌ها

همبستگی معکوس و معنی‌داری مشاهده شد و $ER\alpha$ متیله بیشتر در تومورهای نوع Ductal (۸۹/۱٪) مشاهده شد (Chi-square=۵/۱۶۵، $P=۰/۰۲۳$ و $\Phi=-۰/۲۴$).

میانگین سن در زمان تشخیص بیماری سرطان پستان $۴۹/۶ \pm ۹/۴$ سال تخمین زده شد. سن در زمان تشخیص بیماری در گروه با هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ در مقایسه با گروه غیرمتیله پایین‌تر بود (به ترتیب $۴۸/۶ \pm ۱/۲$ و $۵۰/۵ \pm ۱/۲$ سال). ولی این تفاوت از نظر آماری، معنی‌دار نبود ($P=۰/۲۸۹$). میانگین سنین مربوط به اولین قاعدگی، یائسگی و نخستین بارداری بیماران، بین گروه متیله و گروه غیرمتیله تفاوت چشمگیری نشان داد. همچنین بین طول مدت سنین باروری (مواجهه با استرادیول) طبقه‌بندی شده با وضعیت هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ ارتباط معنی‌داری یافت نشد.

از ۱۳۷ نمونه تومور مورد بررسی، هیپرمتیلاسیون ژن α ER در ۷۰ مورد (۵۱/۱٪) مشاهده شد. در دو مورد، توده فیبروزسیستیک، ژن $ER\alpha$ در وضعیت غیرمتیله قرار داشت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ با تاریخچه فامیلی سرطان پستان، ارتباط معنی‌دار نداشت (جدول ۱). در ۷۶/۳٪ بیماران با متیلاسیون $ER\alpha$ ، تاریخچه فامیلی سرطان پستان، منفی بود ($P=۰/۰۶$). تاریخچه فامیلی دیگر انواع سرطان نیز با هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ ارتباطی نداشت. نتایج رنگ آمیزی IHC، حاکی از عدم بیان پروتئین ER در ۳۳/۳٪ از بیماران (۳۱/۹۳) بود. بین بیان پروتئین ER (IHC) و هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ در تومور، ارتباطی قوی و معکوس یافت شد ($\Phi=-۰/۶۲$ و $P=۰/۰۰۱$ ، Chi-square=۳۵/۱). بین طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی و وضعیت هیپرمتیلاسیون،

جدول ۱- ارتباط بین مشخصات هیستوپاتولوژی، وضعیت بیان گیرنده استروژن (IHC)، تاریخچه فامیلی بیماران مبتلا به

سرطان پستان و وضعیت هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ (n=۱۳۷)

P value	وضعیت هیپرمتیلاسیون <i>ERα</i>		متغیرها
	متیله (n=۷۰)	غیر متیله (n=۶۷)	
			وضعیت بیان گیرنده استروژن
۰/۰۰۱	۲۸(۶۲/۲)	۲(۴/۳)	منفی
	۱۷(۳۷/۸)	۴۵(۹۵/۷)	مثبت
			طبقه بندی هیستوپاتولوژی
۰/۰۲۳	۴۱(۸۹/۱)	۳۰(۶۹/۸)	Ductal
	۵(۱۰/۹)	۱۳(۳۰/۲)	Non-Ductal
			تاریخچه فامیلی سرطان پستان
۰/۰۶۰	۴۱(۷۶/۳)	۴۵(۹۰/۰)	منفی
	۱۴(۲۳/۷)	۵(۱۰/۰)	مثبت
			تاریخچه فامیلی سرطان‌های دیگر
۰/۴۳۴	۱۸(۳۶/۷)	۱۰(۲۸/۶)	منفی
	۳۱(۶۳/۳)	۲۵(۷۱/۴)	مثبت

اعداد داخل پرانتز نمایانگر توزیع فراوانی نسبی است.

برای بررسی روند معنی‌داری P از آزمون Chi-square استفاده شد.

طبق نتایج ارائه شده در جدول ۲ در بین زنان یائسه، طول مدت دوران باروری در بیماران گروه متیله طولانی‌تر از گروه غیرمتیله بود ($P=0/037$). متغیر مصرف سیگار ارتباط معنی‌داری با وضعیت هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ نشان داد ($Chi-square=4/72$, $P=0/030$). در واقع، در بین زنان سیگاری، وضعیت متیلاسیون بیشتر از حالت غیرمتیله بود (جدول ۲). همچنین، در جدول ۲ مقادیر میانگین فولات، ویتامین B_{12} و هموسیستئین تام پلاسما در دو حالت هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ دیده می‌شود. میانگین سطح فولات پلاسمای بیماران گروه متیله به طور معنی‌داری کمتر از گروه غیرمتیله بود ($P < 0/05$) ولی مقدار ویتامین B_{12} پلاسما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد. میزان هموسیستئین تام پلاسما (به عنوان

شاخص حساس به کمبود مزمن فولات) در بین زنان گروه متیله به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر بود ($0/05 < P$). مقادیر هموسیستئین تام با فولات پلاسما ارتباط معکوس ولی غیر معنی‌دار نشان داد ($Phi=-0/166$) و ($Chi-square=0/078$, $P=0/421$). در افراد مسن‌تر از ۴۸ سال، تعداد بیماران با سطح پایین فولات پلاسما در گروه متیله در مقایسه با گروه غیرمتیله فراوان‌تر بود (داده‌ها نشان داده نشده است). بیماران با میزان فولات بالا در گروه غیرمتیله فراوانی بیشتر و معنی‌دار در مقایسه با فراوانی مورد انتظار داشتند ($Chi-square=4/76$, $P=0/029$). چنین نتیجه‌ای در گروه سنی پایین‌تر از ۴۸ سال مشاهده نشد.

جدول ۲- میانگین و توزیع فراوانی متغیرهای مربوط به بیماران مبتلا به سرطان پستان در گروه با هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ و گروه غیرمتیله

P value	وضعیت هیپرمتیلاسیون <i>ERα</i>		متغیرها
	متیله (n=۷۰)	غیرمتیله (n=۶۷)	
سن در زمان تشخیص بیماری (سال)			
۰/۹۹۵	۳۳(۵۱/۶)	۳۲(۵۱/۶)	<۴۸
	۳۱(۴۸/۴)	۳۰(۴۸/۴)	≥۴۸
طول مدت مواجهه با دوران قاعدگی (ماه)			
۰/۲۵۱	۳۹۶±۷۶	۳۷۵±۹۳*	- پیش از یائسگی
۰/۰۳۷	۴۵۸±۵۴	۴۱۵±۷۰	- پس از یائسگی
مصرف سیگار			
۰/۰۳۰	۵۷(۸۳/۸)	۶۲(۹۶/۴۶)	- سیگاری
	۱۱(۱۶/۲)	۳(۴/۶)	- غیر سیگاری
۰/۰۱۷	۹/۲۵±۳/۸	۱۰/۹±۳/۶	
فولات (ng/ml)			
۰/۷۴۷	۴۰۲±۲۱۷	۴۱۹±۳۲۸	ویتامین B12 (pmol/l)
۰/۰۱۵	۸/۴±۳/۹	۶/۸±۲/۶	هموسیستئین تام (μmol/l)

برای بررسی مقادیر پلاسمایی فولات، ویتامین B_{12} و هموسیستئین در بیماران مورد مطالعه تعداد افراد در دو گروه متیله و غیرمتیله به ترتیب شامل ۵۶ و ۵۰ نفر می‌باشند. اعداد داخل پارانتهز نمایانگر توزیع فراوانی نسبی است. * داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نشان داده شده است.

در جدول ۳ مقادیر نسبت شانس (OR) و ۹۵٪ فاصله اطمینان همبستگی مقادیر فولات، ویتامین B₁₂ و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون ERα در بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داده شده است. هیپرمتیلاسیون ژن ERα با مقدار فولات پلاسما ارتباط معکوس داشت و OR تخمینی در حدود ۰/۴۸۵ (۰/۲۲-۱/۰۵ CI) بود (جدول ۳). در حالی که این ارتباط با سطح فولات بعد از تعدیل اثر متغیرها در مدل I معنی‌دار به نظر رسید (OR=۰/۱۷۶; CI ۰/۰۴۸-۰/۶۴۲). بعد از تعدیل ارتباط عوامل مخدوش کننده در مدل II، نقش معکوس

سطح فولات پلاسما در ارتباط با وضعیت هیپرمتیلاسیون ERα معنی‌دار به نظر رسید (OR=۰/۱۸۷). بعد از تعدیل اثر عوامل مداخله‌گر در مدل II یافته‌های به دست آمده، ارتباط معکوس بین مقدار ویتامین B₁₂ پلاسما و هیپرمتیلاسیون ژن ERα نشان داد (OR=۰/۱۸۵; CI ۰/۰۳۶-۰/۹۵۳). نتایج مطالعه حاضر حاکی از ارتباط قوی بین سطح هموسیستئین تام پلاسما و وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن ERα با OR=۹/۶۱ (۱/۲۶۰-۷۳/۲۵ CI) بعد از تعدیل اثر متغیرهای مدل II بود. (محل جدول ۳)

جدول ۳- نسبت شانس خام و تعدیل شده و ۹۵٪ فاصله اطمینان بروز هیپرمتیلاسیون ERα در ارتباط با فولات، ویتامین B₁₂ و هموسیستئین

پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان		
وضعیت هیپرمتیلاسیون ERα		
متغیرهای پلاسمایی	نسبت شانس	۹۵٪ فاصله اطمینان
فولات		
خام	۰/۴۸۵	۰/۲۲۴-۱/۰۵۰
مدل I	۰/۱۷۶	۰/۰۴۸-۰/۶۴۲
مدل II*	۰/۱۸۷	۰/۰۵۲-۰/۶۶۸
ویتامین B₁₂		
خام	۰/۶۵۹	۰/۳۰۷-۱/۴۱۵
مدل I	۰/۲۲۲	۰/۵۸-۰/۸۴۳
مدل II**	۰/۱۸۵	۰/۰۳۶-۰/۹۵۳
هموسیستئین		
خام	۱/۴۱۴	۰/۶۵۹-۳/۰۳۳
مدل I	۲/۱۵۶	۶/۵۹۵-۱/۱۱۴
مدل II***	۹/۶۰۶	۱/۲۶۰-۷۳/۲۵

مقادیر میانه فولات، ویتامین B₁₂ و هموسیستئین به ترتیب شامل ۹/۸ ng/ml، ۳۶۰ pmol/l و ۶/۷ μmole/l تخمین زده شد. مقادیر میانه این متغیرها به عنوان معیار تقسیم بندی دوتایی استفاده شد. گروه مرجع بیمارانی با فولات و ویتامین B₁₂ بالا و هموسیستئین پایین فرض شد.

در مدل I رگرسیون لجستیک چند متغیره با تعدیل اثر سن در تشخیص بیماری، درجه، و اندازه تومور همراه بود.

* فاکتورهایی نظیر طول مدت مواجهه با استرادیول، مصرف سیگار، مواجهه با اشعه X در عکسبرداری رادیولوژی، شرایط یائسگی به همراه متغیرهای مدل I تعدیل شدند.

** فاکتورهایی نظیر تاریخچه فامیلی سرطان پستان، مصرف سیگار، مواجهه با اشعه X در عکسبرداری رادیولوژی به همراه متغیرهای مدل I تعدیل شدند.

*** فاکتورهایی نظیر تاریخچه فامیلی سرطان پستان، طول مدت مواجهه با استرادیول، مصرف سیگار، مواجهه با اشعه X در عکسبرداری رادیولوژی به همراه متغیرهای مدل I تعدیل شدند.

• بحث

همان طور که انتظار می‌رفت، هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ در تعداد قابل ملاحظه‌ای از بیماران (۵۱/۱ درصد) مشاهده شد. در مطالعه‌ای روی زنان هندی مبتلا به سرطان پستان، فراوانی بالایی از هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ (۶۶٪) گزارش شده است، در حالی که پژوهش‌های انجام شده در جوامع غربی، محدوده ۳۰ تا ۵۰ درصدی برای فراوانی هیپرمتیلاسیون گزارش کرده‌اند (۷، ۱۵). بنابراین، با استناد به پژوهش‌های صورت گرفته، توزیع فراوانی نسبی هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ در بین بیماران ایرانی در محدوده یافت شده در سایر بررسی‌ها قرار می‌گیرد.

بر پایه یافته‌های حاضر، بین تومورهای با بیان منفی پروتئین ER و هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ وابستگی منفی وجود داشت و به عبارت دیگر بیشتر تومورهای غیرمتیله، بیان پروتئین ER مثبت داشتند (۴۸/۹٪). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تطابق بین خاموشی بیان پروتئین ER و هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ در اگزون ۱ حاکی از قابلیت متیله شدن منطقه مورد نظر است که می‌تواند در پیش آگهی بیان ژنتیکی نقش منفی داشته باشد.

همسو با یافته‌های مطالعات گذشته، فراوانی هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ بیشتر در تومورهای از نوع Ductal مشاهده شد (۱۶، ۱۱). Bean و همکاران نشان دادند که هیپرمتیلاسیون ژن $BRCA1$ (Breast Cancer-Associated Gene 1) با سرطان پستان فامیلی، ارتباط ندارد. در ضمن، همسو با نتایج بررسی حاضر، یافته‌های پژوهشی روی بیماران مبتلا به سرطان تخمدان حاکی از شیوع بالای متیلاسیون ژن $BRCA1$ در افرادی با تاریخچه منفی سرطان بوده است (۱۷). اما ارتباطی بین تاریخچه فامیلی ابتلا به سرطان و هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ در پژوهش حاضر مشاهده نشد و به نظر می‌رسد شرایط هیپرمتیلاسیون، بیشتر با نوع تک‌گیر (sporadic) تومور ارتباط داشته باشد. برخلاف سرطان موروثی (heritable)، عوامل محیطی در تومورزایی نوع تک‌گیر موثرتر هستند. همچنین به نظر می‌رسد که عوامل محیطی و تغذیه‌ای (فولات و کوبالامین) می‌توانند وضعیت هیپرمتیلاسیون برخی ژن‌ها را تعدیل کنند (۹). با وجود این، تاکنون گزارشی مبنی بر

همبستگی هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ با سن بیمار و عوامل تغذیه‌ای مداخله‌گر (مثل فولات و ویتامین B₁₂) در متابولیسم SAM گزارش نشده است. به نظر می‌رسد که افزایش سن با تکرر مواجهه با عوامل موثر در بروز اختلالات مربوط به هیپر متیلاسیون ژن‌ها در ارتباط باشد. در ضمن، این امر بر حسب نوع بافت بر الگوی متیلاسیون ژن‌ها تاثیر اختصاصی دارد (۱۹، ۱۸، ۵).

نتایج مطالعه حاضر از عدم تاثیر سن در نخستین قاعدگی، بارداری و یائسگی بر بروز متیلاسیون حکایت داشت. با وجود این، طول دوران باروری و در نتیجه، تماس با هورمون استروژن در زنان با هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ بیشتر از گروه غیرمتیله بود. روشن است که استروژن به عنوان محرک تقسیم سلولی و القا کننده بیان ER مطرح است (۲۱، ۲۰) ولی مطالعه‌ای با فرض تاثیر طول دوران باروری (طول مدت مواجهه با استرادیول) در بطن سبب شناسی تغییرات مولکولی نظیر هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ تاکنون انجام نشده است. برخلاف شواهد به دست آمده از بررسی حاضر، یافته‌های مطالعه Li و همکاران نشان داد که هیپرمتیلاسیون ژن $ER\alpha$ بیشتر در سنین پایین مشاهده می‌شود (۱۱). Selnutt و همکاران (۲۲) بر این باورند که تاثیر افزایش سن در ایجاد خطر پیدایش متیلاسیون DNA ممکن است با عدم کفایت دریافت فولات در ارتباط داشته باشد. به عبارت دیگر در افراد سالمند، احتمالاً کمبود فولات به طور بالقوه در متیلاسیون DNA [در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer) CRC] موثر است. همسو با گزارش Selnutt، یافته‌های مطالعه حاضر نیز بر پایین بودن سطح فولات پلاسما در افراد بالای ۴۸ سال با هیپرمتیلاسیون $ER\alpha$ اشاره داشت. در حالی که در گروه غیرمتیله میزان فولات پلاسما بالاتر بود. فولات به عنوان کوآنزیم کلیدی در واکنش متابولیسم متیلاسیون وابسته به SAM نقش دارد (۱۳، ۱۲). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که بین سطح فولات پلاسما و خطر بروز سرطان پستان (۲۳) و بیان پروتئین گیرنده استروژن در بیماران مبتلا به سرطان پستان (۲۴) ارتباط معکوس وجود دارد. یافته‌های به دست آمده در بررسی حاضر نشان داد که در گروه بیماران با $ER\alpha$ متیله، سطح فولات پلاسما در مقایسه با گروه غیرمتیله پایین بود. از طرف دیگر، بین سطح فولات پلاسما و

سطح هموسیستئین در هیپرمیتیلایسیون DNA را مؤثر می‌دانند (۲۶، ۱۴)، ولی شواهد دقیق مبنی بر ارتباط سطح هموسیستئین تام پلاسما با هیپرمیتیلایسیون در مطالعات اپیدمیولوژیک، نادر و متناقض هستند و بیشتر به بافت CRC توجه دارند. در صورتی که که کمبود مزمن یا شدید فولات منجر به اختلالات نابجا در الگوی میتیلایسیون DNA به صورت هیپومیتیلایسیون عمومی DNA و هیپرمیتیلایسیون در جایگاه تنظیم کننده فعالیت برخی از ژن‌های تظاهر پیدا کند (۱۳، ۸) و با توجه به همبستگی معنی‌دار بین سطح هموسیستئین پلاسما و هیپرمیتیلایسیون ژن *ERα* می‌توان در مطالعات بعدی ژن‌های دیگر در حیطه درمانی را بررسی کرد.

در پژوهش حاضر، هیپرمیتیلایسیون ژن *ERα* در تعداد زیادی از مبتلایان به سرطان پستان مشاهده شد. به علاوه، هیپرمیتیلایسیون *ERα* ارتباط نزدیکی با عدم بیان پروتئین گیرنده استروژن و طول دوره باروری داشت. شواهد به دست آمده ارتباط معکوس سطح فولات و ویتامین B₁₂ پلاسما با وضعیت هیپرمیتیلایسیون ژن *ERα* نشان داد و احتمالاً می‌توان به نقش بازدارندگی این ترکیبات مغذی در خاموشی بیان ژن ER اشاره کرد. بنابراین، در صورت دریافت کافی فولات و ویتامین B₁₂ در گذر عمر احتمالاً می‌توان از پیدایش هیپرمیتیلایسیون ژن گیرنده استروژن پیشگیری کرد. ضمناً سطح هموسیستئین پلاسما به عنوان عامل مستعد کننده قوی در بروز هیپرمیتیلایسیون ژن *ERα* معرفی شد. نتایج این مطالعه می‌تواند به درک تداخل محتمل بین عوامل مغذی مؤثر در الگوی غذایی و میتیلایسیون DNA (به خصوص ژن‌های دخیل در درمان هورمونی) و هدایت به سوی مطالعات گسترده تر در بیماران مبتلا به سرطان پستان راهگشا باشد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور برای تامین تسهیلات اعتباری این پژوهش، همکاران محترم بیمارستان تخصصی دی و بیماران عزیز سپاسگزاری می‌شود. در ضمن نتایج منعکس شده در این مقاله از داده‌های پایان‌نامه دوره دکترا بر گرفته شده است.

هیپرمیتیلایسیون *ERα* ارتباط معکوس به دست آمد. این نتایج مطابق یافته‌های *van England* و همکاران مبنی بر شیوع میتیلایسیون پروموتور ژن‌های مختلف در بیماران مبتلا به CRC با دریافت کم فولات در مقایسه با بیماران با دریافت بالای فولات هست، ولی نتیجه پژوهش *van England* از نظر آماری معنی‌دار نبود (۲۵). علاوه بر این، در پژوهش حاضر همبستگی معنی‌دار و معکوس بین میزان ویتامین B₁₂ پلاسما (کوآنزیم دیگر متابولیسم SAM) و هیپرمیتیلایسیون *ERα* مشاهده شد. هر چند بر اساس گزارش‌های پیشین، بر ارتباط سطح بالای ویتامین B₁₂ دریافتی با کاهش خطر بروز سرطان پستان و هیپومیتیلایسیون DNA (در مدل‌های حیوانی) اشاره شده است (۲۳) ولی در مورد هیپرمیتیلایسیون ژن‌های دیگر، گزارش‌های بسیار محدودی در دسترس است و توصیه می‌شود که در مطالعات جامعه‌نگر مورد بررسی قرار گیرند.

کمبود فولات و ویتامین B₁₂ از شاخص‌های مهم و تعیین کننده سطح هموسیستئین بالای خون است. هموسیستئین تام فراورده جانبی هیدرولیز داخل سلولی SAH (*S-adenosylhomocysteine*) است (۶). از طرفی مطالعات در سطح *in vitro* و بررسی‌های حیوانی نشان داده اند که SAH داخل سلولی می‌تواند آنزیم DNMT (*DNA methyl transferase*) را با قدرت بالا مهار کند (۱۳، ۶). در واقع، DNMT در تبدیل SAM به SAH در حین واکنش میتیلایسیون DNA نقش محوری دارد. بنابراین، عوامل مؤثر در تامین ناکافی SAM و یا حذف ناکارآمد SAH می‌تواند در میتیلایسیون DNA اختلال ایجاد کند.

با وجود این، تاکنون مطالعه‌ای در مورد رابطه میزان هموسیستئین تام پلاسما با هیپرمیتیلایسیون *ERα* انجام نشده بود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که سطح هموسیستئین تام پلاسما در بیماران گروه متیله به طور معنی‌دار بیش از بیماران گروه غیرمتیله بود. علاوه بر این، هیپرمیتیلایسیون ژن *ERα* با مقادیر بالای هموسیستئین تام پلاسما بعد از کنترل اثر متغیرهای بالقوه دیگر ارتباط مستقیم داشت. در این میان، مطالعه‌ای که تأکید بر ارتباط سطح هموسیستئین پلاسما با هیپرمیتیلایسیون دیگر ژن‌ها داشته باشد، بسیار انگشت شمار است (۸). با وجود اینکه *Friso* و همکاران نقش

• References

1. 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. *Fam Cnacer* 2003; 2: 117-118.
2. Akbari M, Abachizadeh K, Khayamzadeh M, Tabatabai S, Esnaashari F, Ghanbari A, et al., editors. *Iran Cancer Report*. 1st ed. Tehran; 2008.p. 135-177. [In Persian].
3. Mehrotra J, Vali M, McVeigh M, Kominsky S, Fackler M, Lahti-Domenici J, et al. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. *Clin Cancer Res* 2004; 10 3104-3109.
4. Herman J, Graff J, Myhanen S, Nelkin B, and Baylin S. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826.
5. 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 Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 50-56.
6. Kim Y. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13: 511-519.
7. Lapidus R, Nass S, Butash K, Parl F, Weitzman S, Graff J, et al. Mapping of ER gene CpG island methylation by methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1998; 58: 2515-2519.
8. Johnson I and Belshaw N. Environment, diet and CpG island methylation: Epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1346-1359.
9. Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 2007; 22: 91-103.
10. Chen Y, Toland A, McLennan J, Fridlyand J, Crawford B, Costello J, et al. Lack of germ-line promoter methylation in BRCA1-negative families with familial breast cancer. *Genet Test* 2006; 10: 281-284.
11. Li S, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett* 2006; 237: 272-280.
12. Kim Y. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? *Nutr Rev* 2006; 1: 468-475.
13. Sohn K, Stempak J, Reid S, Shirwadkar S, Mason J, Kim Y. The effect of dietary folate on genomic and p53-specific DNA methylation in rat colon. *Carcinogenesis* 2003; 24 81-90.
14. 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 thorough an interaction with folate status. *PNAS* 2002; 99: 506-5611.
15. Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta S, Ralhan R. Detection of RASSF1A and RARb hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. *Epigenetics* 2006; 1: 88-93.
16. Bae Y, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler M, Sukumar S, et al. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5998-6005.
17. 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 Res* 2000; 60: 5329-5333.
18. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2003; 2: 245-261.
19. Issa J. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-118.
20. Yan L, Yang X, Davidson N. Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 183-192.
21. Mehrotra M, Ganpat Y, Kanaan M, Fackler M, McVeigh M, Lahti-Domenici J, et al. Estrogen receptor/progesterone receptor-negative breast cancers of young African-American women have a higher frequency of methylation of multiple genes than those of Caucasian women. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2052-2057.
22. Shelnutt 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. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 544-560.
23. 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. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 373-380.
24. Zhang S, Hankinson S, Hunter D, Giovannucci E, GA C, Willett W. Folate Intake and Risk of Breast Cancer Characterized by Hormone Receptor Status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2004-2008.
25. van Engeland M, Weijenberg 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 Res* 2003; 63: 3133 - 3137.
26. Friso S, Lamon-Fava S, Jang H, Schaefer E, Corrocher R, Choi S. Oestrogen replacement therapy reduces total plasma homocysteine and enhances genomic DNA methylation in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2007; 97: 617-621.