

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

سعید پیروزپناه<sup>۱</sup>، فروغ اعظم طالبان<sup>۲</sup>، مرتضی عطربی<sup>۳</sup>، علیرضا ابدی<sup>۴</sup>، پروین مهدیپور<sup>۵</sup>

- 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، انتیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیکی: talebanfa@yahoo.de
- ۳- دکترای تخصصی، انتیتو 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 علوم پزشکی تهران، پست الکترونیکی: mehdipor@tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۲۰/۱۱/۸۷

تاریخ دریافت: ۱/۸/۸۷

### چکیده

**ساقه و هدف:** بیان ژنتیکی گیرنده استروژن-آلfa (*Estrogen receptor- $\alpha$ , ER $\alpha$* ) در سلول‌های تومور پستان اهمیت درمانی دارد و بیان این ژن می‌تواند به واسطه هیپرمتیلاسیون در آگزون ۱ مهار شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی ارتباط بین مقادیر فولات، ویتامین B<sub>12</sub> و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمتیلاسیون *ER $\alpha$*  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 کمیلومینیسنس خودکار و هموسیستئین تام پلاسما به وسیله HPLC اندازه‌گیری شد. وضعیت هیپرمتیلاسیون *ER $\alpha$*  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 *ER $\alpha$*  در ۱/۱۵ درصد از بیماران مشاهده شد. هیپرمتیلاسیون ژن *ER $\alpha$*  با تاریخچه مصرف سیگار، طول مدت باروری، به طور مستقیم و با بیان پروتئین ER ارتباط معکوس نشان داد. بعد از تعديل اثر عوامل مخدوش کننده، بین سطح فولات (OR=۰/۶۶۸، ۰/۰۵۲ و ۰/۱۸۷٪ و ویتامین B<sub>12</sub> OR=۰/۰۳۶ و ۰/۰۹۵٪ و ۰/۰۹۵٪ CI) و وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن *ER $\alpha$*  ارتباط معکوس یافت شد. افزون بر این، همبستگی قابل توجهی بین مقدار هموسیستئین تام پلاسما و خطر پیشرفت هیپرمتیلاسیون ژن *ER $\alpha$*  مشاهده شد (OR=۰/۶۱ و ۰/۲۶-۰/۷۳٪ CI٪ ۹۵ و ۹٪ ۹۵).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های این بررسی اثر بالقوه سطح هموسیستئین پلاسما و معکوس فولات و ویتامین B<sub>12</sub> پلاسما بر وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن *ER $\alpha$*  در بیماران مبتلا به سرطان پستان را نشان داد.

**واژگان کلیدی:** ژن گیرنده استروژن-آلfa، 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 $\alpha$*  (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 سنتر SAM (S-آدنوزیل متیونین) و سرانجام، سوبسترا اصلی متیلاسیون داخل سلولی نقش به سزاگی دارد (۱۲، ۱۳). کمبود حاد اسید فولیک، احتمالاً با کاهش متیلاسیون عمومی DNA و افزایش خطر بروز هیپرمتیلاسیون 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 B<sub>12</sub> هم عقیده هستند، ولی بیشتر این یافته‌ها به سرطان کولورکتال محدود می‌شود (۱۴). هم چنین، شواهدی مبنی بر ارتباط سطح اسید فولیک و کوبالامین پلاسمایی با وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* در کارسینومای پستان وجود ندارد. با توجه به شیوع روزافزون سرطان پستان، ضرورت نیاز به بررسی رابطه عوامل تامین کننده گروه متیلی با تغییرات مولکولی در تومور سرطان پستان احساس می‌شد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی ارتباط مقادیر فولات، ویتامین B<sub>12</sub> و هموسیستئین تام پلاسمایی با وضعیت هیپرمتیلاسیون 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 داروهایی مانند تاموكسیفن، 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 تاثیر 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-آلfa (*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 هیپرمتیلاسیون یکی از فرایندهای موثر در کاهش و حتی عدم بیان ژنتیکی بسیاری از ژن‌ها به شمار می‌رود (۴). این تغییر، قابل برگشت است و عموماً روی نوکلئوتید سیتوزین در توالی سیتوزین-گوانوزین (CpG sites) در جایگاه تنظیم ژن (پرموتر) رخ می‌دهد (۵). یافته‌های اکثر مطالعات بر عدم بیان ژنتیکی پروتئین ER در توده سرطان پستان، در اثر هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* تأکید دارند (۷). با اینکه تحقیقات مختلف تحت تاثیر هیپرمتیلاسیون 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 استردادیول اندوژن (طول دوران باروری)، سن بلوغ، نخستین بارداری و یائسگی در رابطه با متیلاسیون ژن *ERα* مورد توجه قرار گرفته اند (۱۱، ۹، ۸). بررسی‌های متعددی نشان داده‌اند که

بررسی هیپرمتیلاسیون ژن: در زمان جراحی، نمونه بافت در نیتروژن مایع ذخیره شد و بعد به فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$ - منتقل شد و سپس DNA با کمک فنل-کلروفرم استخراج شد. صحت DNA استخراج شده با کمک ژل آگارز  $1/5\%$  و خوانش جذب نوری در  $\text{OD}_{260}$  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 Methylation-Specific Polymerase (MSP) تکنیک (Chain Reaction) توالي DNA متیله در مقایسه با توالي غیرمتیله تمیز داده می‌شود. از این رو جهت بررسی وضعیت متیلاسیون ژن  $ER\alpha$ ، از پرایمرهای تنظیم شده برای تولید قطعه  $130\text{ bp}$  در اگزون ۱ ژن  $ER\alpha$  استفاده شد که شامل

$5'-\text{GGATATGGTTGTATTTGTTGT-3'}$  (Sense) و  $5'-\text{ACAAACAAATTCAAAACTCCA-3'}$  (Antisense) است. برای بررسی قطعه غیرمتیله ( $120\text{ bp}$ ) از پرایمرهای  $5'-\text{GATACGGTTGTATTTGTTCGC-3'}$  (Sense) و  $5'-\text{CGAACGATTCAAAACTCCA-3'}$  (Antisense) استفاده شد (۷). دمای Annealing برای هر دو PCR و اکنش  $57^{\circ}\text{C}$  بود. ترکیب واکنش PCR شامل بافر ، PCR (Polymerase Chain Reaction)  $1/25$  میلی مولار  $\text{MgCl}_2$  ،  $2$  میلی مولار dNTPs و پیکومول از هر پرایمر ، واحد از آنزیم Taq پلیمراز و  $100-150$  نانوگرم DNA تیمار شده با بی‌سولفیت سدیم در حجم نهایی  $25$  میکرولیتر بود. فراوردهای PCR به میزان  $20$  میکرولیتر روی ژل پلی آکریلامید  $1.9\%$  بارگذاری شد و سرانجام بعد از رنگ آمیزی مشاهده شد (شکل ۱). از DNA لنفوسيت تیمار شده با بی‌سولفیت سدیم و آب دیونیزه به عنوان کنترل منفی همراه با پرایمرهای اختصاصی متیلاسیون استفاده شد. در

مکمل‌های هورمونی دیگر، متاتروکسات، سیکلوزپورین، تئوفیلین، ضدتشنج، ضدبارداری، فولات و ویتامین  $\text{B}_{12}$  به مدت طولانی (در فاصله زمانی  $12$  تا  $18$  ماه گذشته) و ابتلا به بیماری کلیوی، انواع خوش خیم توده پستانی، هیپرتیروئیدیسم، سابقه شیمی درمانی، پرتودرمانی و هورمون درمانی.

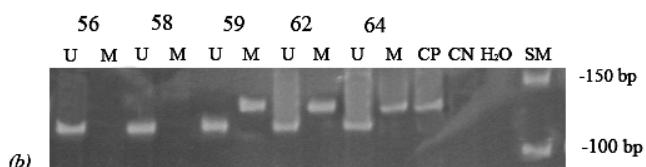
داده‌های برگرفته از گزارش پاتولوژی عبارت بودند از: طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی (Non-ductal Ductal)، درجه بندی هیستوپاتولوژی (Grade I,II,III)، اندازه تومور ( $2/1-5 < 5$  و  $> 5$  سانتی‌متر) و وضعیت بیان ER (Imunohistochemistry, IHC) از افراد مورد مطالعه در رابطه با عوامل دموگرافیک نظری سن در زمان تشخیص بیماری (سال)، سن بلوغ ، یائسگی و نخستین بارداری، تاریخچه فامیلی انواع سرطان (ثبت، منفی)، تاریخچه بیماری (نوع؛ ثبت، منفی) و جراحی (نوع؛ ثبت، منفی) سؤال شد. برای شرکت در پژوهش از بیماران، رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. در ضمن، رعایت اخلاق در پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق انتستیتو و دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی تأیید شده بود.

آزمایش‌های بیوشیمیایی: از  $10-1$  بیمار بعد از  $14$  ساعت ناشتا بودن، قبل از جراحی، به مقدار  $8\text{cc}$  خون گرفته شد و در لوله‌های آغشته به  $7/5\%$  K3-EDTA ریخته شد. پلاسما بعد از سانتریفوژ تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی به فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$ - 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  $\text{B}_{12}$  reagent kit (USA) استفاده شد. میزان هموسیستئین در نمونه‌های مورد بررسی توسط HPLC با آشکارساز فلورسنس اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از درستی بررسی،  $25\%$  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.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: تجزیه و تحلیل آماری SPSS<sub>11.5</sub> داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS<sub>11.5</sub> انجام گرفت. داده‌های کمی پیوسته به صورت Mean±SD نشان داده شده است. برای تحلیل توزیع نرمال متغیرهای کمی پیوسته آزمون کولموگروف- اسمیرنف 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 B<sub>12</sub> پلاسما از آزمون Independen-Sample T-Test بعد از تعديل لگاریتمی استفاده شد. در ضمن، با استفاده از میانه، سطح پلاسمایی فولات، ویتامین B<sub>12</sub> 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 ( $\leq 2$  و  $> 5$  سانتی متر) و درجه بندی هیستوپاتولوژی(I، II و III) و در حالت ۲ (مدل II) تاریخچه فامیلی سرطان پستان (ثبت، منفی)، مصرف سیگار(ثبت ، منفی)، وضعیت یائسگی(ثبت ، منفی)، طول مدت مواجهه با استرادیول (ماه)، مواجهه با اشعه X در عکسبرداری رادیولوژی (داده کمی گستته)، همراه با متغیرهای حالت ۱ کنترل شدند(در صورت داشتن ارتباط قوی با متغیر وابسته و مستقل طبقه‌بندی 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 معنی‌داری تلقی شد.

ضمن از DNA لنفوسيت متيله شده با آنزيم SssI methyltransferase (New England Biolabs,MA) به عنوان كنترل مثبت استفاده شد. برای بررسی پایاپی نتایج هیبریدايشون، آزمایش در مورد کلیه نمونه‌ها ۲ تا ۳ بار تکرار شد. علاوه بر این، در صورت مشاهده باند ضعیف از فراورده PCR، واکنش ۱ PCR تا ۲ بار تکرار شد.

در تفسیر نتایج، وجود شرایط هتروژن متيله و غيرمتيله برای نمونه‌ها نمایانگر حالت متيله بود (شکل ۱). برای تأیید روایی داده‌ها از آنزیم SacII (Cfr42I) و برای ایجاد برش در توالی GCGG روی قطعات متيله شده ژن Lapidus ERα طبق روش 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 اگزون ۱ ژن ERα در کارسینومای پستان آنالیز MSP در اگزون ۱ ژن ERα در کارسینومای پستان (شماره نمونه: ۵۶-۶۴) نشان داده شده است. فراورده‌های PCR در خطوط M و U به ترتیب نشان دهنده باندهای هیبریدیله و غیرمتيله ژن ERα هستند. کنترل مثبت Positive DNA SssI methylase به با آنزیم (Control) CP نمونه تیمار شده با بیوسولفیت سدیم تیمار شده لنفوسيت‌های فرد طبیعی که به واسطه واکنش با بیوسولفیت سدیم تیمار شده است به عنوان کنترل منفی (Negative Control NC) در PCR اسفاده شد. برای آزمون احتمال آسودگی مواد آزمایشگاهی از آب دیونیزه به جای نمونه‌های DNA در هر دوره PCR به کار رفت (H<sub>2</sub>O). اندازه طول فراورده‌های با PCR به ازای bp نشان داده شده است. وجود شرایط هتروژن متيله و غیرمتيله برای نمونه‌ها نمایانگر حالت متيله 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 و  $P=0/023$  و  $\text{Phi}=-0/24$ ).

میانگین سن در زمان تشخیص بیماری سرطان پستان  $49/6 \pm 9/4$  سال تخمین زده شد. سن در زمان تشخیص بیماری در گروه با هیپرمتیلاسیون  $ER\alpha$  در مقایسه با گروه غیرمتیله پایین‌تر بود (به ترتیب  $48/6 \pm 1/2$  و  $50/5 \pm 1/2$  سال). ولی این تفاوت از نظر آماری، معنی‌دار نبود ( $P=0/289$ ). میانگین سنین مربوط به اولین قاعده‌گی، 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  $\alpha$  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 ( $P=0/06$ ). 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 IHC و هیپرمتیلاسیون ژن  $ER\alpha$  در تومور، ارتباطی قوی و معکوس یافت شد ( $\text{Chi-square}=35/1$  و  $P=0/001$  و  $\text{Phi}=-0/62$ ). 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 $ER\alpha$		متغیرها
	متیله (n=۷۰)	غیرمتیله (n=۶۷)	
وضعیت بیان گیرنده استروژن			
0/001	۲۸(۶۲/۲)	۲(۴/۳)	منفی
	۱۷(۳۷/۸)	۴۵(۹۵/۷)	ثبت
طبقه‌بندی هیستوپاتولوژی			
0/023	۴۱(۸۹/۱)	۳۰(۶۹/۸)	Ductal
	۵(۱۰/۹)	۱۳(۳۰/۲)	Non-Ductal
تاریخچه فامیلی سرطان پستان			
0/060	۴۱(۷۶/۳)	۴۵(۹۰/۰)	منفی
	۱۴(۲۳/۷)	۵(۱۰/۰)	ثبت
تاریخچه فامیلی سرطان‌های دیگر			
0/434	۱۸(۳۶/۷)	۱۰(۲۸/۶)	منفی
	۳۱(۶۳/۳)	۲۵(۷۱/۴)	ثبت

اعداد داخل پرانتز نمایانگر توزیع فراوانی نسبی است. برای بررسی روند معنی‌داری P از آزمون Chi-square استفاده شد.

شاخص حساس به کمبود مزمن فولات) در بین زنان گروه متیله به طور قابل ملاحظه ای بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). مقادیر هموسیستئین تام با فولات پلاسمما ارتباط معکوس ولی غیر معنی دار نشان داد ( $\text{Phi} = -0.166$  و  $\text{Chi-square} = 0.078$ ,  $P = 0.421$ ). در افراد مسن تراز ۴۸ سال، تعداد بیماران با سطح پایین فولات پلاسمما در گروه متیله در مقایسه با گروه غیرمتیله فراوان تر بود (داده ها نشان داده نشده است). بیماران با میزان فولات بالا در گروه غیرمتیله فراوانی بیشتر و معنی دار در مقایسه با فراوانی مورد انتظار داشتند ( $\text{Chi}^2 = 4.76$ ,  $P = 0.029$ ). چنین نتیجه ای در گروه سنی پایین تراز ۴۸ سال مشاهده نشد.

طبق نتایج ارائه شده در جدول ۲ در بین زنان یائسه، طول مدت دوران باروری در بیماران گروه متیله طولانی تر از گروه غیرمتیله بود ( $P = 0.37$ ). متغیر مصرف سیگار ارتباط معنی داری با وضعیت هیپرمتیلاسیون  $ER\alpha$  نشان داد ( $\text{Chi-square} = 4.72$ ,  $P = 0.030$ ). 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 پلاسمما در دو حالت هیپرمتیلاسیون  $ER\alpha$  دیده می شود. میانگین سطح فولات پلاسمای بیماران گروه متیله به طور معنی داری کمتر از گروه غیرمتیله بود ( $P < 0.05$ ) ولی مقدار ویتامین  $B_{12}$  پلاسمما تفاوت معنی داری بین دو گروه نشان نداد. میزان هموسیستئین تام پلاسمما (به عنوان

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 $ER\alpha$		متغیرها
	متیله (n=۷۰)	غیرمتیله (n=۶۷)	
۰/۹۹۵	۳۳(۵۱/۶)	۳۲(۵۱/۶)	سن در زمان تشخیص بیماری (سال)
	۳۱(۴۸/۴)	۳۰(۴۸/۴)	<۴۸ ≥۴۸
طول مدت مواجهه با دوران قاعده‌گی (ماه)			
۰/۲۵۱	۳۹۶±۷۶	۳۷۵±۹۳*	- پیش از یائسگی
۰/۰۳۷	۴۵۸±۵۴	۴۱۵±۷۰	- پس از یائسگی
صرف 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	(pmol/l) $B_{12}$
۰/۰۱۵	۸/۴±۳/۹	۶/۸±۲/۶	(μmol/l) هموسیستئین تام

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 می باشند.  
اعداد داخل پارانتر نمایانگر توزیع فراوانی نسبی است.  
\* داده ها به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده است.

سطح فولات پلاسما در ارتباط با وضعیت هیپرمیلاسیون  $ER\alpha$  معنی دار به نظر رسید ( $OR=0.052-0.668$ ; CI ۰.۹۵-۰.۰۵). بعد از تعدیل اثر عوامل مداخله گر در مدل II یافته های به دست آمده، ارتباط معکوس بین مقدار ویتامین  $B_{12}$  پلاسما و هیپرمیلاسیون ژن  $ER\alpha$  نشان داد ( $OR=0.185$ ; CI ۰.۹۵-۰.۰۳۶). نتایج مطالعه حاضر حاکی از ارتباط قوی بین سطح هموسیستئین تام پلاسما و وضعیت هیپرمیلاسیون ژن  $ER\alpha$  با  $ER\alpha$  ( $OR=9.61$ ; CI ۱.۲۶۰-۷۳/۲۵) بعد از تعدیل اثر متغیرهای مدل II بود.

( محل جدول ۳)

در جدول ۳ مقادیر نسبت شانس (OR) و ۹۵٪ فاصله اطمینان همبستگی مقادیر فولات، ویتامین  $B_{12}$  و هموسیستئین تام پلاسما با وضعیت هیپرمیلاسیون در بیماران مبتلا به سرطان پستان نشان داده شده است. هیپرمیلاسیون ژن  $ER\alpha$  با مقدار فولات پلاسما ارتباط معکوس داشت و OR تخمینی در حدود ۰.۴۸۵ (CI ۰.۹۵-۰.۲۲-۱/۰۵) بود (جدول ۳). در حالی که این ارتباط با سطح فولات بعد از تعدیل اثر متغیرها در مدل I معنی دار به نظر رسید ( $OR=0.642$ ; CI ۰.۹۵-۰.۴۸-۰.۱۷۶). بعد از تعدیل ارتباط عوامل مخدوش کننده در مدل II، نقش معکوس

جدول ۳- نسبت شانس خام و تعدیل شده و ۹۵٪ فاصله اطمینان بروز هیپرمیلاسیون  $ER\alpha$  در ارتباط با فولات، ویتامین  $B_{12}$  و هموسیستئین پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان

وضعیت هیپرمیلاسیون $ER\alpha$			
متغیرهای پلاسمایی	نسبت شانس	۹۵٪ فاصله اطمینان	فولات
خام	۰/۴۸۵	۰/۲۲۴-۱/۰۵۰	
I مدل	۰/۱۷۶	۰/۰۴۸-۰/۶۴۲	
**Mدل II	۰/۱۸۷	۰/۰۵۲-۰/۶۶۸	

ویتامین $B_{12}$			
متغیرهای پلاسمایی	نسبت شانس	۹۵٪ فاصله اطمینان	ویتامین $B_{12}$
خام	۰/۶۵۹	۰/۳۰۷-۱/۴۱۵	
I مدل	۰/۲۲۲	۰/۵۸-۰/۸۴۳	
**Mدل II	۰/۱۸۵	۰/۰۳۶-۰/۹۵۳	

هموسیستئین			
متغیرهای پلاسمایی	نسبت شانس	۹۵٪ فاصله اطمینان	هموسیستئین
خام	۱/۴۱۴	۰/۶۵۹-۳/۰۳۳	
I مدل	۲/۱۵۶	۶/۵۹۵-۱/۱۱۴	
***Mدل II	۹/۶۰۶	۱/۲۶۰-۷۳/۲۵	

مقادیر میانه فولات، ویتامین  $B_{12}$  و هموسیستئین به ترتیب شامل  $360 \text{ pmol/l}$ ،  $9.8 \text{ ng/ml}$  و  $6.7 \mu\text{mole/l}$  تخمین زده شد. مقادیر میانه این متغیرها به عنوان معیار تقسیم بندی دو تابعی استفاده شد. گروه مرجع بیمارانی با فولات و ویتامین  $B_{12}$  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.

همبستگی هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  با سن بیمار و عوامل تغذیه‌ای مداخله‌گر (مثل فولات و ویتامین  $B_{12}$ ) در متابولیسم SAM گزارش نشده است. به نظر می‌رسد که افزایش سن با تکرر مواجهه با عوامل موثر در بروز اختلالات مربوط به هیپرمتیلاسیون زن‌ها در ارتباط باشد. در ضمن، این امر بر حسب نوع بافت بر الگوی متیلاسیون زن‌ها تاثیر اختصاصی دارد (۱۸، ۱۹، ۲۰).

نتایج مطالعه حاضر از عدم تاثیر سن در نخستین قاعده‌گی، 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 زن  $ER\alpha$  بیشتر از گروه غیرمتیله بود. روشن است که استروژن به عنوان محرك تقسیم سلولی و القا کننده بیان  $ER$  مطرح است (۲۱). ولی مطالعه‌ای با فرض تاثیر طول دوران باروری (طول مدت مواجهه با استرادیول) در بطن سبب شناسی تغییرات مولکولی نظیر هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  تاکنون انجام نشده است. برخلاف شواهد به دست آمده از بررسی حاضر، یافته‌های مطالعه  $Li$  و همکاران نشان داد که هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  بیشتر در سنین پایین مشاهده می‌شود (۱۱).  $Selnett$  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 CRC (Colorectal Cancer)] موثر است. همسو با گزارش *Shelnutt* یافته‌های مطالعه حاضر نیز بر پایین بودن سطح فولات پلاسمایی در افراد بالای ۴۸ سال با هیپرمتیلاسیون  $ER\alpha$  اشاره داشت. در حالی که در گروه غیرمتیله میزان فولات پلاسمایی 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 پلاسمایی و خطر بروز سرطان پستان (۲۳) و بین 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 پلاسمایی در مقایسه با گروه غیرمتیله پایین بود. از طرف دیگر، بین سطح فولات پلاسمایی و

## • بحث

همان طور که انتظار می‌رفت، هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  در تعداد قابل ملاحظه‌ای از بیماران (۵۱/۱۱ درصد) مشاهده شد. در مطالعه‌ای روی زنان هندی مبتلا به سرطان پستان، فراوانی بالایی از هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  (۶۶٪) گزارش شده است، در حالی که پژوهش‌های انجام شده در جوامع غربی، محدوده ۳۰ تا ۵۰ درصدی برای فراوانی هیپرمتیلاسیون گزارش کرده‌اند (۱۵، ۷).

بنابراین، با استناد به پژوهش‌های صورت گرفته، توزیع فراوانی نسبی هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  در بین بیماران ایرانی در محدوده یافتن شده در سایر بررسی‌ها قرار می‌گیرد.

بر پایه یافته‌های حاضر، بین تومورهایی با بیان منفی پروتئین  $ER$  و هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  وابستگی منفی وجود داشت و به عبارت دیگر بیشتر تومورهای غیرمتیله، بیان پروتئین  $ER$  مثبت داشتند (۹/۴۸٪). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تطابق بین خاموشی بیان پروتئین  $ER$  و هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  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 زن  $ER\alpha$  بیشتر در تومورهایی از نوع مشاهده شد (۱۶، ۱۱). *Bean* و همکاران نشان دادند که هیپرمتیلاسیون زن  $BRCA1$  (Breast Cancer–Associated Gene 1) پستان فامیلی، ارتباط ندارد. در ضمن، همسو با نتایج بررسی حاضر، یافته‌های پژوهشی روی بیماران مبتلا به سرطان تخدمان حاکی از شیوع بالای متیلاسیون زن  $BRCA1$  در افرادی با تاریخچه فامیلی ابتلا به سرطان و هیپرمتیلاسیون زن  $ER\alpha$  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 زن‌ها را تعدیل کنند (۹). با وجود این، تاکنون گزارشی مبنی بر

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

در پژوهش حاضر، هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* در تعداد زیادی از مبتلایان به سرطان پستان مشاهده شد. به علاوه، هیپرمتیلاسیون *ERα* ارتباط نزدیکی با عدم بیان پروتئین گیرنده استروژن و طول دوره باروری داشت. شواهد به دست آمده ارتباط معکوس سطح فولات و ویتامین  $B_{12}$  پلاسمما با وضعیت هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* نشان داد و احتمالاً می‌توان به نقش بازدارندگی این ترکیبات مغذي در خاموشی بیان ژن ER اشاره کرد. بنابراین، در صورت دریافت کافی فولات و ویتامین  $B_{12}$  گذر عمر احتمالاً می‌توان از پیدایش هیپرمتیلاسیون ژن گیرنده استروژن پیشگیری کرد. ضمناً سطح هموسیستئین پلاسمما به عنوان عامل مستعد کننده قوى در بروز هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* معروفی شد. نتایج این مطالعه می‌تواند به درک تداخل محتمل بین عوامل مغذي مؤثر در الگوی غذایی و متیلاسیون 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 انسستیتو 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.

هیپرمتیلاسیون *ERα* ارتباط معکوس به دست آمد. این نتایج مطابق یافته‌های *van England* و همکاران مبنی بر شیوع متیلاسیون پرموتر 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  $B_{12}$  پلاسمما (کوانزیم دیگر متابولیسم SAM) و هیپرمتیلاسیون *ERα* مشاهده شد. هر چند بر اساس گزارش‌های پیشین، بر ارتباط سطح بالای ویتامین  $B_{12}$  دریافتی با کاهش خطر بروز سرطان پستان و هیپرمتیلاسیون DNA (در مدل‌های حیوانی) اشاره شده است (۲۳) ولی در مورد هیپرمتیلاسیون ژن‌های دیگر، گزارش‌های بسیار محدودی در دسترس است و توصیه می‌شود که در مطالعات جامعه‌نگر مورد بررسی قرار گیرند.

کمبود فولات و ویتامین  $B_{12}$  از شاخص‌های مهم و تعیین کننده سطح هموسیستئین بالای خون است. هموسیستئین تام فراورده جانبی هیدرولیز داخل سلولی (*S-adenosylhomocysteine*) SAH مطالعات در سطح *in vitro* و بررسی‌های حیوانی نشان داده اند که SAH داخل سلولی می‌تواند آنزیم (DNA methyl transferase) DNMT مهار کند (۶، ۱۳). در واقع، DNMT در تبدیل SAM به SAH در حین واکنش متیلاسیون DNA نقش محوری دارد. بنابراین، عوامل موثر در تامین ناکافی SAM و یا حذف ناکارآمد SAH می‌تواند در متیلاسیون DNA اختلال ایجاد کند.

با وجود این، تاکنون مطالعه‌ای در مورد رابطه میزان هموسیستئین تام پلاسمما با هیپرمتیلاسیون *ERα* انجام نشده بود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که سطح هموسیستئین تام پلاسمما در بیماران گروه متیله به طور معنی‌دار بیش از بیماران گروه غیرمتیله بود. علاوه بر این، هیپرمتیلاسیون ژن *ERα* با مقداری بالای هموسیستئین تام پلاسمما بعد از کنترل اثر متغیرهای بالقوه دیگر ارتباط مستقیم داشت. در این میان، مطالعه‌ای که تأکید بر ارتباط سطح هموسیستئین پلاسمما با هیپرمتیلاسیون 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 Mehdipour 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, Myhaneen 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 RASSFIA and RAR $\beta$  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. Shelton 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.