



پروفایل متیلاسیون نواحی پروموتوری MINT1، MINT2، MINT25 و MINT31 در بیماران مبتلا به سرطان

معدده

نسبیه طبیبی جبلی: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
شیرین شهبازی: گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (نویسنده مسئول) sh.shahbazi@modares.ac.ir
الهام تابش: گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

سرطان معده،
متیلاسیون DNA،
جزایر CpG،
مهارکننده‌های پمپ پروتون

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۱/۱۹

زمینه و هدف: ویژگی CpG island methylator phenotype (CIMP) که در بدخیمی‌های متعدد مشاهده می‌شود، یک مجموعه تغییرات اپی ژنتیکی است که با متیلاسیون پروموتور و خاموشی سرکوبگرهای تومور مرتبط است. پژوهش حاضر به بررسی پروفایل متیلاسیون نواحی پروموتوری MINT1، MINT2، MINT25 و MINT31 در بیماران مبتلا به سرطان معده پرداخته است.

روش کار: در این مطالعه بیماران سرطان معده از نوع آدنوکارسینوما در سنین بین ۵۰ تا ۸۵ سال مشارکت داشته و نمونه برداری از بافت‌های سرطانی و کنترل با روش آندوسکوپی انجام شد. طبق پروتکل کیت‌های انتخابی، DNA بافت‌ها استخراج و سپس با بیسولفیت تیمار گردید. با استفاده از روش MS-PCR نواحی مورد نظر تکثیر و بر روی ژل پلی آکریل امید ارزیابی شدند. **یافته‌ها:** نتایج به دست آمده نشان داد که ۵۲/۹٪ از بافت‌های آدنوکارسینوما معده CIMP مثبت بوده که شامل ۴۱/۲٪ CIMP-Low و ۱۱/۷٪ CIMP-High می‌شدند. مارکر MINT25 با ۷۶٪ مثبت، بیشترین میزان متیلاسیون را به خود اختصاص داده بود. این در حالی است که در گروه کنترل هیچ مورد مثبت MINT25 مشاهده نشد که می‌تواند تاییدی بر اختصاصیت این مارکر باشد. در رتبه بعدی MINT31 با ۵۳٪ مثبت قرار داشت. ژن‌های MINT1 و MINT2 به ترتیب در ۱۷/۷٪ در صد و ۱۱/۸٪ در صد موارد مثبت ارزیابی شدند. ارتباط آماری معنی‌داری بین مصرف داروهای مهارکننده پمپ پروتون و متیلاسیون نواحی پروموتوری MINT25 و MINT31 به دست آمد.

نتیجه‌گیری: فنوتیپ CIMP قابلیت معرفی به عنوان یک بیومارکر در تشخیص سرطان معده را دارد که البته انتخاب پروفایل متیلاسیون باید بر اساس ویژگی‌های هر جمعیت استاندارد سازی شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین ۴ ناحیه ژنی پیشنهادی MINT25 ارتباط آماری معنی‌داری با سرطان معده و همچنین با سابقه مصرف داروهای مهارکننده پمپ پروتون دارد که دال بر اهمیت بررسی این مارکر در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان معده است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Tabibi Jebeli N, Shahbazi S, Tabesh E. Methylation Profile of MINT2, MINT1, MINT25 and MINT31 Promoter Regions in Patients with Gastric Cancer. Razi J Med Sci. 2023;30(1): 95-105.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

Methylation Profile of MINT2, MINT1, MINT25 and MINT31 Promoter Regions in Patients with Gastric Cancer

Nasibe Tabibi Jebeli: Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Shirin Shahbazi: Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (*Corresponding Author) sh.shahbazi@modares.ac.ir

Elham Tabesh: Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Abstract

Background & Aims: Gastric cancer is the fifth most common cancer and the fourth leading cause of cancer death in the world. This genetically heterogeneous condition can be sporadic or inherited as an autosomal trait. One of the most important causes of sporadic gastric cancer is environmental factors such as *Helicobacter pylori* infection. In recent decades, proton-pump inhibitors (PPIs) have been widely used to treat gastrointestinal problems. New researches raise concerns about the link between PPIs and gastric cancer. The CpG island methylator phenotype (CIMP) seen in various malignancies is a set of epigenetic changes associated with promoter methylation and down regulation of the tumor suppressor genes. The present study investigated the methylation profile of *MINT2*, *MINT1*, *MINT25* and *MINT31* promoter regions in patients with gastric cancer. The *MINT1* gene, also known as Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 1 (APBA1), is located on 9q and encodes a protein which is involved in signal transduction processes. Studies have shown a significant increase in *MINT1* hypermethylation in gastric cancer tissues significantly associated with *Helicobacter pylori* infection. The *MINT2* gene, or Amyloid-beta A4 precursor protein-binding, family A, member 2 (APBA2), has been mapped to the 15q region. Abnormal methylation of *MINT2* has been identified in the blood and peritoneal fluid of patients with gastric cancer suggesting that it can be used as a predictor of peritoneal micrometastasis. The next two gene regions, *MINT25* and *MINT31*, are functionally different. In fact, *MINT25* is the Matrix metalloproteinase 24 (MMP24) gene, located at 20q. Studies have shown that *MINT25* hypermethylation is a specific molecular marker for gastric cancer screening. The *MINT31* marker is located at 17q in the non-coding region upstream of the *CACNA1G* gene, which is a T-Type Calcium Channel. *MINT31* plays an important role in regulating *CACNA1G* expression. Studies have shown that hypermethylation of the *MINT31* region can be used as a predictor of gastric cancer progression. Based on these findings, the present study investigates the methylation profile of *MINT2*, *MINT1*, *MINT25* and *MINT31* promoter regions in patients with gastric cancer. Another goal of this project was to investigate the correlation between this methylation profile and patients' clinical characteristics.

Methods: In this descriptive-analytical study, patients with adenocarcinoma gastric cancer between the ages of 50 and 85 years old were studied. The age matched control group included non-cancerous gastrointestinal patients who referred for endoscopy. Tumor and control tissue samples were collected by endoscopy. Collected tissue samples were extracted using the GENTBIO kit and DNA samples were kept at -20. Methylation-specific PCR (MSP) was used to determine the methylation pattern of selected gene regions. Bisulfite treatment was performed by Bisulfite Conversion Kit (ZYMO RESEARCH). Briefly, bisulfite solutions were prepared according to the kit instructions and were added to the samples. The mixtures were incubated for 5 hours then centrifugation was performed. In the next step a combination of BL buffer and carrier RNA were added to the products. The samples were then thoroughly mixed with ethanol and transferred to Epitect columns. BW wash buffer and BD desulfurizing buffer were used in later stages to improve DNA quality. For each reaction of PCR we used 2X PCR-master mix, 0.5 μ l of each forward and reverse primers with a concentration of 10 μ M and 50ng DNA. The following temperature program was applied: 15 minutes at 95 $^{\circ}$ C, 35 cycles including 20 seconds at 95 $^{\circ}$ C, 30 seconds annealing with variable and specific temperature for each pair of primers, extension for 25 seconds at 72 $^{\circ}$ C and final extension for 5

Keywords

Gastric cancer,
DNA Methylation,
CpG islands,
Proton Pump Inhibitors

Received: 05/02/2023

Published: 08/04/2023

minutes at 72°C. The annealing temperature of the primer pairs was standardized between 51-60°C. PCR products were evaluated by 8% polyacrylamide gel stained with silver nitrate. After collecting and extracting the results, the data were analyzed using SPSS software version 19. P value less than 0.05 was considered significant.

Results: Methylation profile of *MINT2*, *MINT1*, *MINT25* and *MINT31* promoter regions was assessed on polyacrylamide gel after treatment with bisulfite and MS-PCR. Each gene was amplified by a pair of primers for methylated (M) and a pair of primers for non-methylated (U) regions. In case of positive methylation of one or two genes, the situation was considered CIMP-Low phenotype and in case of positive methylation of 3 or 4 genes, phenotype was recorded as a CIMP-High. If the methylation of all four genes was negative, the CIMP-Negative phenotype was recorded. The results showed that CIMP was positive in 52.9% of gastric adenocarcinoma tissues, which included 41.2% CIMP-Low and 11.7% CIMP-High. *MINT25* with 76% positive had the highest methylation rate. Interestingly, no positive cases of *MINT25* were observed in the control group which could confirm the specificity of this marker. *MINT31* was next with 53% positive cases. In control samples for three promoter regions, methylation results were negative and only two positive cases were observed regarding *MINT31*. *MINT1* and *MINT2* genes were evaluated positive in 17.7% and 11.8% of cases, respectively. According to these results, there was a statistically significant correlation between PPIs and methylation of *MINT25* and *MINT31* promoter regions. Considering all 4 gene regions as CIMP phenotype, the significance of the results was reduced, which could be due to the low sample size of positive cases in *MINT1* and *MINT2*. Contrary to expectations, no significant link was observed between the *Helicobacter pylori* infection and methylation of each gene alone. However, the CIMP-Positive phenotype showed a stronger association with *Helicobacter pylori* infection than individual genes, although this association was not reached the significant level.

Conclusion: Gastric cancer is a multifactorial disease that despite the discovery of several predisposing genes, scientific evidence still indicates the important role of environmental factors in its development. Studies have shown the effective role of epigenetic changes in gastric carcinogenesis. Methylation of many genes has been studied in gastrointestinal cancers, including gastric cancer. Epigenetic instability, characterized by hypermethylation of multiple CpG islands, is known as the CIMP phenotype. CIMP-positive tumors indicate that hypermethylation has occurred simultaneously in the promoter regions of several tumor suppressor genes. This leads to inactivation of gene transcription and consequent loss of their function. So far, different gene sets have been selected to study CIMP in a variety of cancers, due to the heterogeneity of histological features in tumors and patient populations. In the present study, the promoter regions of *MINT1*, *MINT2*, *MINT25* and *MINT31* in patients with gastric cancer were examined and the results confirmed the presence of CIMP-Low and CIMP-High phenotypes in these samples. In our study, the correlation between methylation pattern and clinical characteristics of patients was also investigated. Statistical analyzes showed a significant link between methylation of *MINT25* and *MINT31* promoter regions with the PPIs. Evidence from several studies suggests that long-term use of PPIs is associated with a higher risk of gastric cancer. However, some studies have suggested that this risk may be limited to people with a history of *Helicobacter pylori* infection or precancerous lesions of the stomach. Because PPIs induce hypergastrinemia and cellular hyperplasia, they could increase the risk of gastric cancer. Overall, the results of our study show that the CIMP phenotype can be introduced as a biomarker in the diagnosis of gastric cancer, although the methylation profile selection should be standardized based on the characteristics of each population. The results of our study showed that among the 4 proposed gene regions, *MINT25* has a statistically significant correlation with gastric cancer and also with a history of PPIs, which indicates the importance of studying this marker in Iranian patients with gastric cancer.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Tabibi Jebeli N, Shahbazi S, Tabesh E. Methylation Profile of *MINT2*, *MINT1*, *MINT25* and *MINT31* Promoter Regions in Patients with Gastric Cancer. *Razi J Med Sci.* 2023;30(1): 95-105.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

سرطان معده به عنوان پنجمین سرطان شایع و چهارمین عامل مرگ بر اثر سرطان در جهان شناخته می شود. این بیماری می تواند به صورت تک گیر (Sporadic) ایجاد گردد و یا منشای ارثی داشته باشد. حدود ۱۰٪ موارد در شاخه ارثی جای می گیرند که از این میان ۱ تا ۳٪، بر اثر سندرم های ارثی شناخته شده مانند Hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) ایجاد می گردد (۱).

از مهم ترین عوامل سرطان معده به صورت تک گیر، عوامل محیطی مانند عفونت هلیکوباکتری پیلوری است. به دنبال التهاب مزمن القا شده توسط هلیکوباکتری پیلوری، عوامل دیگر از جمله ویژگی های ژنتیکی فرد و تاثیرات محیطی می توانند در روند ترمیم آسیب های سلولی اختلال ایجاد کنند که باعث تغییراتی در تکثیر و آپوپتوز می شود. از دیگر عوامل تاثیر گذار در ابتلا به سرطان معده مصرف داورها می باشد. در دهه های گذشته داروهای مهارکننده پمپ پروتون (Proton-pump inhibitors (PPIs) در سراسر جهان به طور گسترده جهت درمان مشکلات گوارشی تجویز شده اند. مکانیزم اثر این داروها سرکوب قوی اسید معده است که منجر به آتروفی معده و رشد بیش از حد باکتری در معده می شود. تحقیقات جدید نگرانی هایی در مورد ارتباط داروهای PPIs و ابتلا به سرطان معده ایجاد کرده اند (۲).

تغییرات اپی ژنتیکی ژن های سرکوبگر تومور، عامل مهم دیگری است که در نهایت باعث سرطان زایی وابسته به التهاب می شود. شناخته شده ترین تغییر اپی ژنتیکی، متیلاسیون DNA می باشد که نقش کلیدی در سرطان زایی معده دارد به صورتی که به عنوان یک مارکر کارآمد برای تشخیص زودهنگام پیشنهاد شده است (۳). فنوتیپ CpG Island Methylator (CIMP) Phenotype بیانگر متیله شدن همزمان پروموتور چندین ژن یا لوکوس است. اگرچه مکانیسم این هایپرمتیله شدن همزمان هنوز نامشخص است، ولی مطالعات نشان داده است که افزایش فعالیت آنزیم متیل ترانسفراز نقش مهمی در ایجاد این فنوتیپ دارد. کاهش بیان ژن های سرکوبگر تومور متعاقب متیله شدن سیتوزین جزایر CpG پروموتور آن ها از مهم ترین

مکانیسم های پیشرفت سرطان در انسان می باشد. امروزه از CIMP به عنوان مارکر پیش بینی کننده برای کمک به انتخاب درمان در انواع سرطان استفاده می شود (۴).

در بررسی فنوتیپ CIMP نواحی متعدد ژنی کاندید شده اند که می توان به *MINT1*، *MINT2*، *MINT25* و *MINT31* اشاره کرد. از میان این نواحی ژنی، *MINT1* و *MINT2* اعضای خانواده Munc18-1-interacting protein 1 (MINT) هستند که به سبب برهمکنش با پروتئین Munc18-1 که یک پروتئین نورونی است، در این خانواده دسته بندی شده اند (۵).

ژن *MINT1* با نام دیگر Amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1 (*APBA1*) در ناحیه کروموزومی 9q21.12 قرار گرفته است. اعتقاد بر این است که پروتئین کد شده توسط این ژن در فرآیند های انتقال سیگنال نقش دارد. همچنین مطالعات نشان داده است که افزایش قابل توجه هایپرمتیلاسیون *MINT1* در بافت های سرطان معده با عفونت هلیکوباکتری پیلوری ارتباط معناداری داشته است (۶).

ژن *MINT2* یا Amyloid beta a4 precursor protein-binding, family a, member 2 (*APBA2*) در ناحیه کروموزومی 15q13.1 نقشه برداری شده است. هایپرمتیلاسیون *MINT2* هر چند به عنوان یک فاکتور ضعیف برای پیش آگهی سرطان معده شناسایی شده، ولی مشخص شده متیلاسیون غیر عادی *MINT2* در خون و مایع صفاق افراد مبتلا به سرطان معده می تواند به عنوان یک فاکتور پیش بینی کننده میکرومتاستاز به صفاق کاربرد داشته باشد (۷).

دو ناحیه ژنی بعدی یعنی *MINT25* و *MINT31* از نظر عملکردی متفاوت هستند. در حقیقت *MINT25* نام دیگر ژن Matrix metalloproteinase 24 (*MMP24*) است که در 20q11.22 واقع گردیده است (۸). مطالعات نشان داده هایپرمتیلاسیون *MINT25* یک مارکر مولکولی حساس و اختصاصی برای غربالگری سرطان معده می باشد (۹).

مارکر *MINT31* در 17q21.33 و در ناحیه غیر کد شونده بالادست ژن *CACNA1G* که یک T-Type Calcium Channel است قرار گرفته و در تنظیم بیان

۱K اضافه و در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در مراحل بعد از اتانول خالص و بافرهای دیگر طبق دستورالعمل کیت استفاده و نهایتاً با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر نگهدارنده و انکوبه کردن در دمای اتاق، استخراج DNA تکمیل و نمونه‌های به دست آمده تا مراحل بعدی تحقیق در ۲۰- نگه داری شد.

کشت سلول جهت استاندارد سازی تست‌ها: جهت استاندارد سازی تست‌ها از دو رده سلول سرطان معده در کنار نمونه‌های بیماران استفاده شد. رده‌های سلولی Human gastric adenocarcinoma medullary type (MKN45) و denocarcinoma gastric cell line (AGS) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) حاوی ۱۰٪ Fetal bovine serum (FBS) کشت داده شدند. سوسپانسیون سلولی (با غلظت حدود 1×10^5 سلول در هر میلی‌لیتر) در فلاسک‌های مخصوص کشت قرار گرفته و فلاسک‌ها در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂ تا زمان جمع آوری سلول‌ها نگهداری شدند. مراحل استخراج DNA از رده سلولی مشابه مراحل استخراج از بافت انجام گردید.

تغییرات بی‌سفولیت جهت بررسی متیلاسیون: سدیم بی‌سفولیت به صورت انتخابی سیتوزین‌ها را در جزایر CpG به ۵-متیل سیتوزین دآمیننه کرده و به یوراسیل تبدیل می‌کند. این امر منجر به یک تغییر اولیه در توالی DNA می‌شود به صورتی که سیتوزین‌های متیله از غیرمتیله با کمک تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Polymerase chain reaction (PCR) قابل تشخیص خواهد شد.

بی‌سولفیت کردن DNA توسط Bisulfite Conversion Kit (ZYMO RESEARCH) انجام شد. ابتدا در یک میکروتیوب محلول بی‌سولفیت که طبق دستور کیت آماده سازی شده بود به DNA اضافه و سانتریفیوژ مختصر انجام شد و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند. بعد از اتمام فرآیند تغییرات بی‌سولفیت، سانتریفیوژ مختصر برای لوله‌های محتوی محصول واکنش انجام و بافرهای مورد نظر به محصول

آن نقش مهمی دارد (۱۰). مطالعات نشان داده است هاپرمتیلاسیون نواحی MINT31 می‌تواند به عنوان یک مارکر پیشگویی کننده برای پیشرفت سرطان معده و همچنین پایدار ماندن یا بدتر شدن وضعیت به صورت Noninvasive neoplasia (NIN) استفاده شود (۱۱).

بر اساس این یافته‌ها، پژوهش حاضر به بررسی پروفایل متیلاسیون نواحی پرموتری MINT2, MINT1, MINT25, و MINT31 در بیماران مبتلا به سرطان معده می‌پردازد. بررسی ارتباط این پروفایل و مشخصات بالینی بیماران یکی دیگر از اهداف این پروژه بود.

روش کار

نمونه گیری: این مطالعه با کد اخلاق IR.MODARES.REC.1397.145 به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید و قبل از نمونه گیری از بیماران رضایت آگاهانه اخذ گردیده است. محرمانه بودن اطلاعات فردی بیماران و خانواده آن‌ها رعایت شده و نمونه‌های افراد شرکت‌کننده در مطالعه صرفاً با کد مخصوص هر فرد مشخص و در جریان آزمایش‌ها و آنالیز اطلاعات وارد شده است. در این تحقیق که به صورت توصیفی تحلیلی انجام گرفته است، ۱۷ بیمار سرطان معده از نوع آدنوکارسینوما مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران بین ۵۰ تا ۸۵ سال و از هر دو جنسیت انتخاب شدند. نمونه گیری توسط پزشک متخصص اندوسکوپی بر طبق پروتکل‌های استاندارد از بخش جراحی بیمارستان خورشید اصفهان انجام گرفت. نمونه گیری از گروه کنترل که از نظر سنی با گروه بیمار مطابقت داشتند نیز در همان مرکز انجام شد. این گروه شامل ۷ بیمار گوارشی غیر سرطانی که به توصیه پزشک جهت آندوسکوپی مراجعه کرده بودند، می‌شد. نمونه‌های گرفته شده در مرکز آندوسکوپی با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج DNA: استخراج نمونه از بافت‌های سرطانی و کنترل با استفاده از کیت کم‌پانی GENTBIO انجام گرفت. به ۲۰ میلی گرم از بافت، ۲۰۰ میکرو لیتر از بافر کیت و ۲۰ میکرو لیتر پروتئیناز

۳ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط شد و نمونه ها به درون چاهک های ژل ریخته شدند. به منظور رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید از روش رنگ آمیزی نترات نقره استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل و قرار دادن آن بر روی دستگاه، نمونه ها با استفاده از نشانگر اندازه بررسی شدند.

تجزیه و تجزیه داده ها: پس از جمع آوری و استخراج نتایج، داده ها با استفاده از نرم افزار Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) نسخه ۱۹ تجزیه و تحلیل شد. برای تحلیل داده ها از آمار توصیفی شامل جداول، نمودارها و شاخص های عددی مناسب (میانگین و انحراف معیار) و آمار استنباطی شامل آزمون کای دو و تحلیل واریانس استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

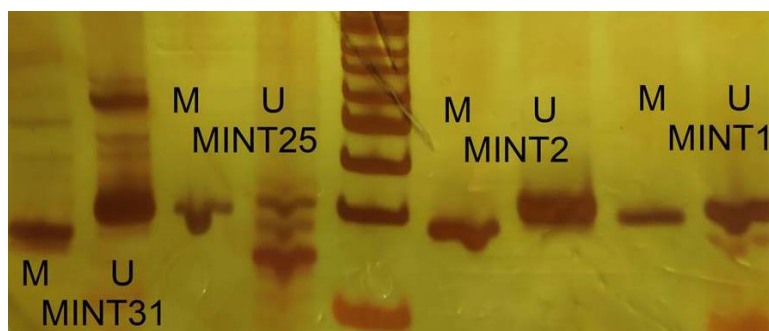
نتایج حاصل از MS-PCR: مطالعه متیلاسیون نواحی پروموتوری *MINT1*، *MINT2*، *MINT25* و *MINT31* پس از تیمار با بیسولفیت و MS-PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید صورت گرفت. همان طور که شکل ۱ نشان می دهد، هر کدام از ژن ها تو سب یک جفت پرایمر متیله (M) و یک جفت پرایمر غیر متیله (U) تکثیر و نتایج وضعیت متیلاسیون ثبت گردید. در صورت مثبت بودن متیلاسیون یک یا دو ژن، فنوتیپ CIMP-Low و در صورت مثبت بودن متیلاسیون ۳ یا ۴ ژن فنوتیپ CIMP-High در نظر گرفته شد. در صورتی که متیلاسیون هر چهار ژن منفی بود، این فنوتیپ CIMP-Negative ثبت گردید.

میزان فراوانی متیلاسیون نواحی پروموتوری در نمونه های بیماران و کنترل: نتایج بررسی الگوهای متیلاسیون در سل لاین های MKN45 و AGS سرطان معده مشخص کرد که این دو رده سلولی الگوهای متیلاسیون متفاوت دارند. در MKN45 نواحی ژنی *MINT25* و *MINT31* متیله بودند که نشان دهنده وضعیت CIMP-Low می باشد در حالی که در لاین سلولی AGS سطح بالایی از متیلاسیون مشاهده شد؛ به عبارت دیگر واجد وضعیت CIMP-High بود.

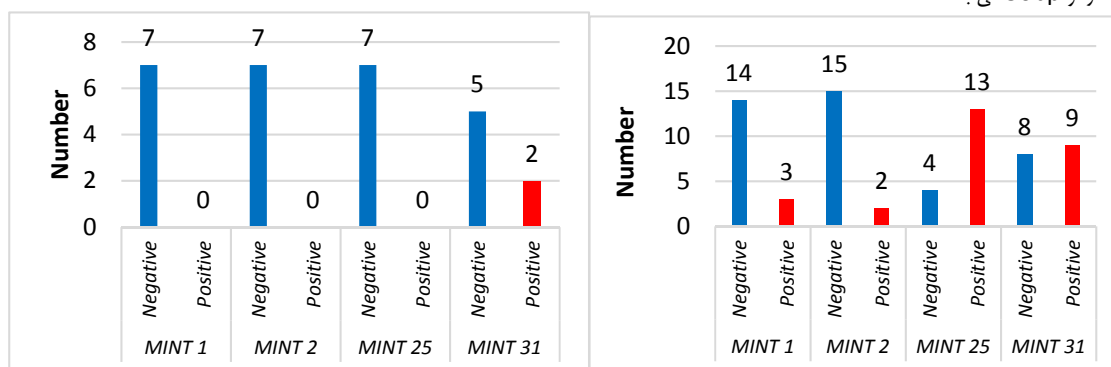
اضافه شد. سپس نمونه ها به طور کامل با اتانول مخلوط و به ستون های کیت منتقل شدند. بافر شستشوی و بافر دسولفونه کننده در مراحل بعد جهت ارتقای کیفیت DNA به کار برده شد و در نهایت DNA بیسولفیتی در دمای ۲۰- درجه نگه داری شد تا برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

PCR اختصاصی متیلاسیون، Methylation-specific PCR (MSP) برای تعیین الگو متیلاسیون از تکنیک PCR اختصاصی متیلاسیون یا MSP که یک روش کیفی می باشد، استفاده شد. روش MSP نیازمند دو جفت پرایمر می باشد، یک جفت پرایمر مستقیم و معکوس اختصاصی برای DNA تیمار شده با بی سولفیت نوع متیله و یک جفت پرایمر مستقیم و معکوس اختصاصی برای DNA تیمار شده با بیسولفیت از نوع غیرمتیله. در این مطالعه، از پرایمرهایی که در مقالات قبلی گزارش شده بود استفاده شد (۱۲، ۱۳). کنترل های اختصاصی کیت به عنوان نمونه های کنترل متیله و غیر متیله استفاده شدند. برای هر واکنش از PCR Master mix در غلظت نهایی $2 \times$ ، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس به غلظت ۱۰ میکرو مولار و ۵۰ نانوگرم DNA با بر نامه دمایی زیر انجام شد: وا سرتگی اولیه ۱۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل شامل واسرشتگی ۲۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال ۳۰ ثانیه با دمای متغیر و اختصاصی برای هر جفت پرایمر، طویل سازی ۲۵ ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد و نهایتاً ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت تکمیل طویل سازی های نیمه تمام. دمای اتصال اختصاصی جفت پرایمرها بین ۵۱-۶۰ درجه سانتی گراد استانداردسازی شدند.

ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید: از ژل پلی آکریل آمید ۸٪ به نسبت ۲۹:۱ در حجم نهایی محلول ۲۵ میلی لیتر برای بررسی محصولات PCR استفاده شد. ژل از ترکیب آکریل آمید-بیس آکریل آمید (۳۰٪)، بافر Ammonium persulfate، Tris-borate-EDTA (TBE) (APS) و Tetramethylethylenediamine (TEMED) طبق دستورالعمل های استاندارد تهیه گردید. پس از بستن ژل، میزان ۲ میکرولیتر از هر کدام از نمونه ها با



شکل ۱- نتایج حاصل از MS-PCR بر روی ژل اکریل آمید مشاهده می‌شود. نتایج مربوط به نمونه بافت توموری است که در هر چهار ناحیه پروموتری MINT25، MINT2، MINT1 و MINT31، متیلاسیون مشاهده می‌شود که دال بر فنوتیپ CIMP-High است. M، محصول PCR پرایمر مستقیم و معکوس اختصاصی برای DNA متیله و U، محصول PCR پرایمر مستقیم و معکوس اختصاصی برای DNA غیر متیله می‌باشد. چاهک میانی یا پنجم نشان دهنده مارکر 50bp می‌باشد.



شکل ۲- وضعیت متیلاسیون نواحی پروموتری MINT1، MINT2، MINT25، MINT31. سمت راست: گروه کنترل، سمت چپ: گروه بیماران آدنوکارسینومای معده

ترتیب در ۱۷/۷٪ و ۱۱/۸٪ موارد مثبت ارزیابی شدند (جدول ۱).

جدول ۱ علاوه بر درصد های متیلاسیون در گروه‌های مختلف، در مجموع نشان دهنده نتایج کلی به دست آمده فراوانی CIMP نیز می‌باشد. نتایج آمار توصیفی نشان داد که در حدود نیمی از بیماران آدنوکارسینومای معده، هیچ کدام از این ۴ ناحیه ژنی متیله نبوده است (۴۷/۱ درصد) که در حقیقت گروه CIMP-Negative را تشکیل داده اند.

موارد مثبت از نظر متیلاسیون هم کمی بیشتر از ۵۰٪ موارد را به خود اختصاص داده بود که شامل ۴۱/۲ درصد CIMP-Low و ۱۱/۸ درصد CIMP-High بودند.

بررسی ارتباط بین متیلاسیون نواحی پروموتری و ویژگی های بالینی بیماران: در جدول ۲ نتایج داده‌های بررسی ارتباط CIMP با خصوصیات کلینیکی بیماران آورده شده است. آزمون آماری کای-دو مقادیر

شکل ۲ نشان دهنده نتایج کلی به دست آمده از ارزیابی متیلاسیون نواحی پروموتری MINT1، MINT2، MINT25، MINT31 در نمونه‌های بیماران و نمونه‌های کنترل می‌باشد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود در نمونه های کنترل برای سه ناحیه پروموتری نتایج متیلاسیون منفی بود. در خصوص ناحیه چهارم یا MINT31، ۲ نمونه متیلاسیون پروموتری را نشان دادند. در نمونه های بیماران آدنوکارسینومای معده، MINT25 با ۱۳ مورد (۷۶٪) مثبت در مقابل ۴ مورد منفی بیشترین میزان متیلاسیون را به خود اختصاص داده بود. این در حالی است که در گروه کنترل هیچ مورد مثبت MINT25 مشاهده نشد که می‌تواند تاییدی بر اختصاصیت مناسب این مارکر باشد (شکل ۲).

در رتبه بعدی از نظر متیلاسیون، MINT31 با ۵۳٪ مثبت قرار دارد که البته این مارکر دو مورد مثبت هم در گروه کنترل داشت. ژن های MINT1 و MINT2 به

جدول ۱ - فراوانی CIMP در نمونه های بیماران و کنترل

	یافته های MS-PCR (%) تعداد	CIMP-Negative (%) تعداد	CIMP-Low (%) تعداد	CIMP-High (%) تعداد
کنترل	MINT1 منفی	۷ (%۱۰۰)	۵ (%۷۱/۴)	۲ (%۲۸/۶)
	MINT1 مثبت	-		
	MINT2 منفی	۷ (%۱۰۰)		
	MINT2 مثبت	-		
آدنوکارسینوما	MINT25 منفی	۷ (%۱۰۰)		
	MINT25 مثبت	-		
	MINT31 منفی	۵ (%۷۱/۵)		
	MINT31 مثبت	۲ (%۲۸/۵)		
آدنوکارسینوما	MINT1 منفی	۱۴ (%۸۲/۳)	۸ (%۴۷/۱)	۷ (%۴۱/۲)
	MINT1 مثبت	۳ (%۱۷/۷)		
	MINT2 منفی	۱۵ (%۸۸/۳)		
	MINT2 مثبت	۲ (%۱۱/۸)		
	MINT25 منفی	۴ (%۲۳/۵)		
	MINT25 مثبت	۱۳ (%۷۶/۶)		
	MINT31 منفی	۸ (%۴۷)		
	MINT31 مثبت	۹ (%۵۳)		

جدول ۲- بر سی معنی داری ارتباط بین متیلاسیون نواحی پروموتری *MINT1*، *MINT2*، *MINT25*، *MINT31* و فراوانی CIMP با مشخصات

بالینی بیماران	عفونت هلیکوباکتر پیلوری	سابقه سرطان در خانواده	مصرف داروهای مرتبط با معده	مصرف سیگار	جنسیت	یافته های متیلاسیون
	۰/۷۸۲	۰/۳۸۳	۱	۱	۰/۱۱۰	MINT1
	۰/۷۸۲	۰/۵۵۱	۰/۳۰۲	۰/۳۰۲	۰/۲۰۸	MINT2
	۰/۵۳۳	۱	۰/۰۲۱	۰/۲۴۸	۰/۵۴۲	MINT25
	۰/۲۶۸	۰/۲۴۸	۰/۰۴۶	۰/۳۱۷	۰/۷۷۲	MINT31
	۰/۰۸۶	۰/۷۵۵	۰/۵۹۰	۰/۵۹۰	۰/۵۸۵	CIMP-Positive

تنهایی مشاهده نشد. اما در جمع بندی کلی، فنوتیپ CIMP-Positive در مقایسه با ژن ها منفردا، ارتباط قوی تری را با عفونت هلیکوباکترپیلوری نشان داد؛ اگرچه این ارتباط به سطح معنی داری آماری نرسید.

بحث

بیماری سرطان معده یک بیماری چند عاملی است که علی رغم کشف ژن های متعدد مرتبط با استعداد ژنتیکی این بیماری، همچنان شواهد علمی بر نقش مهم عوامل محیطی در ایجاد این بیماری دلالت دارد. مطالعات همچنین نقش موثر تغییرات اپی ژنتیکی در

احتمال ارتباط ویژگی های بالینی با نواحی ژنی به تفکیک و فنوتیپ CIMP در مجموع را نشان می دهد. طبق این نتایج ارتباط آماری معنی داری بین مصرف PPIs و متیلاسیون نواحی پروموتری *MINT25* و *MINT31* وجود داشت. با در نظر گرفتن هر ۴ ناحیه ژنی به صورت فنوتیپ CIMP از معنی داری این نتایج کاسته شد که می تواند ناشی از حجم نمونه پایین موارد مثبت در دو ناحیه ژنی دیگر یعنی *MINT1* و *MINT2* باشد.

برخلاف انتظار ارتباط معنی داری بین سابقه ابتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری و موارد متیلاسیون هر ژن به

۲۰۰۵ مطالعه بر روی نمونه های سرطان معده و بررسی ارتباط آن با ۶ مورد CIMP انتخابی، مشابه نواحی مورد مطالعه حاضر شامل *MINT1*, *MINT2*, *MINT25*, *MINT31*, *hMLH1*, *p16* نشان داد، میزان CIMP در بافت های سرطانی بسیار بیشتر از بافت های طبیعی می باشد که مطابق با نتایج این مطالعه می باشد. همچنین مشخص شد که میان فنوتیپ CIMP و ناپایداری میکروستلاستی در سرطان معده ارتباطی وجود دارد (۱۹). در همین راستا مطالعه دیگری ارتباط بین CIMP-High و بقای بهتر در سرطان معده را با انتخاب و بررسی متیلاسیون چندین ناحیه ژنی شامل: *MINT1*, *MINT 2*, *MINT 25*, *MINT 31* نشان دادند (۲۰). با استفاده از پایگاه داده ای اطللس ژنوم سرطان: <https://www.cancer.gov/aboutnci/organization> و به کارگیری [ccg/research/structural-genomics/tega](http://cgc/research/structural-genomics/tega) یک روش خوشه بندی سلسله مراتبی بر اساس ۲۰۸۲ ناحیه متیلاسیون مرتبط با سرطان معده، تایید شد که بین فنوتیپ CIMP و پیش آگهی سرطان معده رابطه مثبت وجود دارد. نتایج نشان داد که در گروه CIMP-High میزان جهش سوماتیک در تومور و ناپایداری میکروستلاستی بیشتر رخ می دهد (۲۱). مطالعه جامع متآنالیز با تاکید بر تفاوت پانل های ژنی انتخابی در ارزیابی وضعیت CIMP در مطالعات مختلف نشان داد که نمونه هایی CIMP-High با بقای ۵ ساله ضعیف تر همراه بودند (۴). اگرچه مطالعه ای دیگر با اشاره به هتروژنیته سرطان معده نتایج این مطالعه جامع را تایید نکرده و اشاره کرده اند که پس از لحاظ کردن آماری این ناهمگنی زیاد و استفاده از مدل اثرات تصادفی، هیچ ارتباطی بین CIMP-High با بقای ضعیف ۵ ساله مشاهده نشد (۲۲).

در مطالعه جدیدی، نقش (ARID1A) T-rich interactive domain 1A که یکی از اجزای کمپلکس SWItch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF) می باشد در القای CIMP بررسی شد. تجزیه و تحلیل متیلاسیون DNA در سطح ژنوم نشان داد که حذف ARID1A در سلول های آدنوکارسینوم معده، متیلاسیون نابجای تعداد قابل توجهی از سایت های CpG را القا

سرطان زایی زودرس معده را نشان داده اند (۱۴). متیلاسیون ژن های زیادی در سرطان های دستگاه گوارشی از جمله سرطان معده بررسی شده است. ناپایداری اپی ژنتیکی که با هایپرمتیلاسیون جزایر CpG متعدد مشخص می شود، به عنوان فنوتیپ CIMP شناخته می گردد. تومور های مثبت CIMP بدین معنی است که به طور همزمان هایپرمتیلاسیون در مناطق پروموتور چندین ژن سرکوبگر تومور رخ داده است. این امر منجر به غیر فعال شدن رونویسی ژن ها و در نتیجه از دست دادن عملکرد آن ها می شود (۱۵). تاکنون گروه های مختلف ژنی برای بررسی CIMP در انواع سرطان ها انتخاب شده اند که از دلایل آن، ناهمگونی ویژگی های بافت شناسی در تومورها و جمعیت های بیماران بوده است (۱۶).

در مطالعه حاضر نواحی پروموتری *MINT1*, *MINT2*, *MINT25* و *MINT31* در بیماران مبتلا به سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده وجود فنوتیپ های CIMP-Low و CIMP-High را در این نمونه ها تایید کرد. *MINT25* با ۱۳ مورد (۷۶٪) مثبت در مقابل ۴ مورد منفی بیشترین میزان متیلاسیون را به خود اختصاص داده بود. این در حالی است که در گروه کنترل هیچ مورد مثبت *MINT25* مشاهده نشد که می تواند تاییدی بر اختصاصیت مناسب این مارکر باشد.

مطالعاتی در باره ارتباط CIMP ژن های مختلف با سرطان معده انجام شده است. در سال ۱۹۹۹ مطالعه بر روی CIMP های منتخب در سرطان معده شامل *MINT2*, *MINT4*, *MINT6*, *MINT12*, *MINT25*, *MINT31*, *hMLH1*, *p16* تایید کرد که CIMP یکی از مهم ترین مسیرهایی است که در تومورزایی این بافت نقش دارد (۱۷). در سال ۲۰۰۴ مطالعه ای ارتباط میان ۶ مورد انتخابی شامل ژن های *MINT1*, *MINT2*, *MINT25*, *MINT31*, *p14*, *p16* با عارضه پولیپ معده Fundic gland polyps (FGP) پرداخت و به این نتیجه رسید که CIMP نقش مهمی در پیشرفت برخی FGP ها به خصوص مواردی که دارای اثرات مهارکننده پمپ پروتونی هستند، دارد (۱۸). در سال

زودهنگام سرطان معده می تواند کاربرد جدید و پیشرفته آن باشد. در تحقیقات اخیر با استفاده از روش MCTA-Seq، یک تجزیه و تحلیل متیلاسیون بر روی نمونه‌های پلاسمایی ۸۲ بیمار مبتلا به سرطان معده انجام گرفت و مشخص شد که در DNA آزاد پلاسمایی ظرفیت تشخیصی CIMP وجود دارد (۲۸).

نتیجه‌گیری

در مجموع می توان نتیجه گرفت که فنوتیپ CIMP قابلیت این را دارد که به عنوان یک بیو مارکر در تشخیص سرطان معرفی شود. انتخاب پروفایل ژنی این فنوتیپ باید بر اساس ویژگی های هر جمعیت استاندارد سازی شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از بین ۴ ناحیه ژنی پیشنهادی *MINT25* ارتباط معنادارتری با سرطان معده دارد. همچنین ارتباط معنادارتری با سابقه مصرف داروهای PPI نشان داد که می تواند بر اهمیت بررسی این مارکر در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان معده بیفزاید.

تقدیر و تشکر

ما از شرکت کنندگان در این پروژه تشکر می‌کنیم.

References

- Oliveira C, Suriano G, Ferreira P, Canedo P, Kaurah P, Mateus R, et al. Genetic screening for familial gastric cancer. *Heredit Cancer Clin Pract.* 2004;2(2):51-64.
- Cheung KS, Leung WK. Risk of gastric cancer development after eradication of *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest Oncol.* 2018;10(5):115-23.
- Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.* 2014;345(2):196-202.
- Powell A, Soul S, Christian A, Lewis WG. Meta-analysis of the prognostic value of CpG island methylator phenotype in gastric cancer. *Br J Surg.* 2018;105(2):e61-e8.
- Tang F, Xiao D, Chen L, Gao H, Li X. Role of Munc18-1 in the biological functions and pathogenesis of neurological disorders (Review). *Mol Med Rep.* 2021;23(3).
- Liu JB, Wu XM, Cai J, Zhang JY, Zhang JL, Zhou

کرده و می تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های بالقوه القای CIMP عمل کند (۲۳).

بررسی های بیان ژن و پروفایل پروتئومیکس در ۱۴ رده سلولی معده، و ۴۶۷ نمونه سرطان معده اولیه نیز نشان داد که آنزیم سیستاتینوین بتاستناز (CBS) عامل راجعه خاموشی اپی ژنتیک CIMP می باشد. مشخص شد که حتی در شرایط پیش‌بدخیم سرطان معده، CIMP القا می شود که CBS به عنوان یک اصلاح‌کننده دو وجهی متیلاسیون و التهاب در سرطان معده می تواند عامل آن محسوب شود (۲۴).

در مطالعه حاضر ارتباط الگوی متیلاسیون با ویژگی های بالینی بیماران نیز بررسی شد. آنالیزهای آماری ارتباط معنی داری بین متیلاسیون نواحی پروموتوری *MINT25* و *MINT31* با مصرف داروهای PPIs نشان داد. شواهد به دست آمده از مطالعات متعدد نشان می‌دهد که استفاده طولانی‌مدت از PPIs با خطر بالاتر ابتلا به سرطان معده مرتبط است. البته برخی مطالعات اشاره کرده اند که این خطر احتمالاً محدود به افرادی است که سابقه فعلی یا گذشته عفونت هلیکوباکتریلوری و یا ضایعات پیش سرطانی معده دارند، می‌شود (۲۵). از آنجا که PPIs هیپرگاسترینمی و هیپرپلازی سلولی را القا می کنند، خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهند (۲۶). البته مطالعاتی هم در این راستا انجام شد که اثر مستقیم این داروها در ایجاد سرطان معده را با قطعیت تایید نکرده و اثر ضعیفی برای آن برآورد شده است. به عنوان مثال یک مطالعه مورد-شاهدی شامل پایگاه داده مراقبت های اولیه اسکاتلند و Biobank انگلستان یک افزایش خطر نسبی با میزان ریسک خطر ۱/۴۹ و ۱/۲۴ را به ترتیب در دو گروه یاد شده نشان داد (۲۷).

از محدودیت های این تحقیق می توان به حجم نمونه محدود اشاره کرد. پیشنهاد می شود این تحقیق با حجم نمونه بالاتری در دسته بندی های بالینی متعدد صورت پذیرد تا الگوی دقیق تری از مارکر های مناسب تشخیصی در سرطان معده معرفی گردد. با توجه به پیشرفت های اخیر در زمینه توسعه بیومارکرهای غیر تهاجمی پلاسمایی، استاندارد سازی CIMP در تشخیص

- SH, et al. CpG island methylator phenotype and Helicobacter pylori infection associated with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(36):5129-34.
7. Han J, Lv P, Yu JL, Wu YC, Zhu X, Hong LL, et al. Circulating methylated MINT2 promoter DNA is a potential poor prognostic factor in gastric cancer. *Digest Dis Sci*. 2014;59(6):1160-8.
8. Kinoh H, Hayashita H, Kajita M, Okada A, Seiki M. Assignment of the genes for membrane-type-4 matrix metalloproteinase (Mmp17, MMP17) to mouse chromosome 5, human chromosome band 12q24.3 and membrane-type-5 matrix metalloproteinase (Mmp24, MMP24) to mouse chromosome 2 and human chromosome band 20q11.2-->q12, respectively, by radiation hybrid and in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;87(1-2):97-8.
9. Watanabe Y, Kim HS, Castoro RJ, Chung W, Estecio MR, Kondo K, et al. Sensitive and specific detection of early gastric cancer with DNA methylation analysis of gastric washes. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2149-58.
10. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res*. 1999;59(18):4535-41.
11. Negrini M, Miotto E, Sabbioni S, Cardin R, Rugge M, Tieppo C, et al. MINT31 methylation in gastric noninvasive neoplasia: potential role in the secondary prevention of gastric cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2012;21(5):442-8.
12. Cho HJ, Kim SY, Kim KH, Kang WK, Kim JI, Oh ST, et al. The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines. *World J Surg Oncol*. 2009;7:49.
13. Lee JH, Park SJ, Abraham SC, Seo JS, Nam JH, Choi C, et al. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene*. 2004;23(26):4646-54.
14. Yoda Y, Takeshima H, Niwa T, Kim JG, Ando T, Kushima R, et al. Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(1):65-76.
15. Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H. Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenet*. 2016;8:25.
16. Zhang X, Zhang W, Cao P. Advances in CpG Island Methylator Phenotype Colorectal Cancer Therapies. *Front Oncol*. 2021;11:629390.
17. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, et al. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res*. 1999;59(21):5438-42.
18. Abraham SC, Park SJ, Cruz-Correa M, Houlihan PS, Half EE, Lynch PM, et al. Frequent CpG island methylation in sporadic and syndromic gastric fundic gland polyps. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(5):740-6.
19. An C, Choi IS, Yao JC, Worah S, Xie K, Mansfield PF, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(2 Pt 1):656-63.
20. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, et al. Genetic, epigenetic, and clinicopathologic features of gastric carcinomas with the CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*. 2006;106(7):1467-79.
21. Zeng Z, Xie D, Gong J. Genome-wide identification of CpG island methylator phenotype related gene signature as a novel prognostic biomarker of gastric cancer. *Peer J*. 2020;8:e9624.
22. Xiao H, Fu J, Abe M, Ji J, Zong L. Prognostic value of CpG island methylator phenotype in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2018;109(8):2623-5.
23. Yamada H, Takeshima H, Fujiki R, Yamashita S, Sekine S, Ando T, et al. ARID1A loss-of-function induces CpG island methylator phenotype. *Cancer Lett*. 2022;532:215587.
24. Padmanabhan N, Kyon HK, Boot A, Lim K, Srivastava S, Chen S, et al. Highly recurrent CBS epimutations in gastric cancer CpG island methylator phenotypes and inflammation. *Genome Biol*. 2021;22(1):167.
25. Cheung KS, Leung WK. Long-term use of proton-pump inhibitors and risk of gastric cancer: a review of the current evidence. *Ther Adv Gastroenterol*. 2019;12:1756284819834511.
26. Waldum HL, Fossmark R. Proton pump inhibitors and gastric cancer: a long expected side effect finally reported also in man. *Gut*. 2018;67(1):199.
27. Liu P, McMenamin ÚC, Johnston BT, Murchie P, Iversen L, Lee AJ, et al. Use of proton pump inhibitors and histamine-2 receptor antagonists and risk of gastric cancer in two population-based studies. *Br J Cancer*. 2020;123(2):307-15.
28. Ren J, Lu P, Zhou X, Liao Y, Liu X, Li J, et al. Genome-Scale Methylation Analysis of Circulating Cell-Free DNA in Gastric Cancer Patients. *Clin Chem*. 2022;68(2):354-64.