



تغییر بیان ژن های Lnc-OC1 و SIRT1 در بافت سرطان کولورکتال

مریضیه حداد اصفهانی: کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
پریسا محمدی نژاد: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران (* نویسنده مسئول)
Parisa_mohamadynejad@yahoo.com

چکیده

کلیدواژه‌ها

سرطان کولورکتال،
ژن Lnc-OC1،
ژن SIRT1

زمینه و هدف: *SIRT1* با استیل‌اسیون هیستون‌ها و فاکتورهای رونویسی متعدد، در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله متابولیسم، حفاظت نورونی، senescence و پاسخ‌های التهابی نقش مهمی ایفا می‌کند. با این حال مکانیسم‌های پیچیده سیگنالینگ *SIRT1* در تومورزایی هنوز کاملاً مشخص نیست به طوری که هم به عنوان آنکوژن و هم به عنوان سرکوبگر تومور عمل می‌کند. از سوی دیگر مشخص شده که *Lnc-OCI* با مهار *miR-34a*، تکثیر سلولی، تشکیل کلنی، مهاجرت سلول‌ها را القا می‌کند و بدین ترتیب نقش آنکوژنی در تومورزایی ایفا می‌کند. با توجه به نقش تنظیمی *miR-34a* در بیان ژن *SIRT1*، هدف از این تحقیق بررسی همزمان میزان بیان *Lnc-OCI* و *SIRT1* در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در مقایسه با بافت سالم کولون است.

روش کار: در تحقیق مورد شاهدهی حاضر RNA تام از ۳۵ نمونه بافت توموری و بافت سالم مبتلایان به سرطان کولورکتال استخراج شد و پس از سنتز cDNA میزان بیان ژن‌های *Lnc-OCI* و *SIRT1* در دو بافت توموری و سالم هر فرد مقایسه شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزارهای GraphPad Prism و Excel استفاده شد و پس از تایید نرمال بودن حجم نمونه با آزمون Shapiro جهت بررسی اختلاف بیان ژن‌ها در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و بافت سالم از آزمون T-test استفاده شد و *p* value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معناداری در نظر گرفته شد. در کلیه مراحل این تحقیق کدهای اخلاق تحقیق و نشر رعایت شده است.

یافته‌ها: در پژوهش حاضر بیان ژن *Lnc-OCI* در بافت‌های توموری نسبت به بافت سالم به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p=0/002$). برعکس بیان ژن *SIRT1* در بافت‌های سالم نسبت به بافت توموری افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<0/0001$). بنابراین به نظر می‌رسد در سرطان کولورکتال بیان ژن *Lnc-OCI* افزایش و بیان ژن *SIRT1* کاهش می‌یابد.
نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد در سرطان کولورکتال افزایش بیان ژن *Lnc-OCI* با کاهش بیان ژن *SIRT1* همراه می‌شود که در صورت تایید در مطالعات وسیع‌تر می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در سرطان کولورکتال مطرح باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Hadad Esfahani M, Mohamadynejad P. Altered expression of Lnc-OC1 and SIRT1 genes in colorectal cancer tissue. Razi J Med Sci. 2021;27(11):59-71.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

Altered expression of Lnc-OC1 and SIRT1 genes in colorectal cancer tissue

Marzieh Hadad Esfahani: Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Parisa Mohamadynejad : Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran (* Corresponding author) Parisa_mohamadynejad@yahoo.com

Abstract

Background & Aims: Colorectal cancer is one of the most common cancers in the world, with the third most common cancer in men and the second most common cancer in women. According to the World Health Organization in 2018, 861,000 people died of colorectal cancer. Also, 1.8 million new cases of this cancer are diagnosed annually. However, high mortality rates have been reported in colorectal cancer but key factors in various aspects of the disease remain unknown. SIRT1 (silent information regulator 1) plays an important role in many physiological processes, including metabolism, neuronal protection, senescence and inflammatory, by staging histones and multiple transcription factors. However, the complex mechanisms of SIRT1 signaling in tumors are not yet fully understood, as it acts as both an oncogene and a tumor suppressor. On the other hand, it has been shown that the Lnc-OC1 (lncRNA associated with ovarian cancer 1) gene inhibits cell proliferation, colony formation, invasion and migration by inhibiting miR-34a, and thus plays an incognito role in tumor formation. lncRNAs control various physiological and pathological processes including transcription, translation, chromatin alterations, cell cycle, cell differentiation, oncogene signaling pathways, and tumor suppressor genes in cancer. Accordingly, much attention has been paid to the role of lncRNAs in complex human diseases, including cancer. In SIRT1 3'-UTR mRNA, a response element miR-34a was detected and several independent studies have shown that miRNA inhibits mRNA translation by binding to 3'-UTR SIRT1 mRNA, thereby reducing the amount of sirtuin protein in the cell. Given the regulatory role of miR-34a in the expression of SIRT1 gene, the aim of this study was to simultaneously evaluate the expression of Lnc-OC1 and SIRT1 expression in tumor tissue of patients with colorectal cancer compared with healthy colonic tissue.

Methods: In the present case-control study, the tumor tissue of 35 patients with colorectal cancer (from Poursina Hakim Clinic in Salamat Town) and the healthy tissue of each person's colon were sampled. All tissue samples (tumor and healthy) were examined by a pathologist and approved according to the reported criteria. In order to extract total RNA, trisol (Invitrogen) was used according to the protocol. Then, in order to quantitatively evaluate the extracted RNA using a nanodrop device (2000 Thermo), the amount of light absorption was measured at 260 to 280 wavelength (the concentration range of RNAs was 1.8-2). Also, for qualitative analysis, the extracted RNA was electrophoresed on 1% agarose gel. On the other hand, to study the expression of the desired genes, specific reciprocating primers of each gene, after designing with Aligo version 7 and BLAST software on the NCBI website, were synthesized by Pishgam Company. GAPDH gene was studied as a housewife gene due to very small expression changes in colorectal tissue. After

Keywords

Colorectal cancer,
Lnc-OC1 gene,
SIRT1 gene

Received: 03/10/2020

Published: 28/01/2021

cDNA synthesis, the accuracy of cDNA synthesis was assessed using CR and specific primers. Finally, the expression of Lnc-OC1 and SIRT1 genes in both tumor and healthy tissue of each person was compared. GraphPad Prism and Excel softwares were used to analyze the data and after confirming the normality of the sample size with Shapiro test, T-test was used to examine the differences in gene expression in tumor tissue of patients with colorectal cancer and healthy tissue. One way ANOVA test was used to compare gene expression at different stages. Pearson test was also used to examine the correlation between the expression of the genes in this study. It should be noted that in all statistical calculations, p value less than 0.05 was considered as a significant level. In all stages of this research, codes of ethics of research and publication have been observed. This research has been approved by the ethics committee of Shahrekord Azad University with the code IR.IAU.SHK.REC.1399.037.

Results: In the present study, the expression of Lnc-OC1 gene in tumor tissues was significantly increased compared to healthy tissue ($p=0.002$). In contrast, the expression of the SIRT1 gene in healthy tissues showed a significant increase compared to tumor tissue ($p<0.0001$). Thus, in colorectal cancer, the expression of the Lnc-OC1 gene appears to increase and the expression of the SIRT1 gene decreases. Although the expression of these two genes in tumor tissue has a positive correlation, but this expression correlation is not significant. Also, the results of this analysis showed that the expression level of these genes did not change significantly at different stages of the disease. ROC diagrams for changes in SIRT1 and Lnc-OC1 gene expression showed that SIRT and Lnc-OC1 genes can be used as independent variables to differentiate patient tissue from healthy and can help predict the likelihood of cancer.

Conclusion: It seems that in colorectal cancer, increased Lnc-OC1 gene expression is associated with decreased SIRT1 gene expression, which, if confirmed in larger studies, could be a therapeutic target in colorectal cancer.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Hadad Esfahani M, Mohamadynejad P. Altered expression of Lnc-OC1 and SIRT1 genes in colorectal cancer tissue. Razi J Med Sci. 2021;27(11):59-71.

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

مقدمه

سرطان روده بزرگ از شایع‌ترین سرطان‌ها در سراسر جهان است به طوریکه سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان در زنان معرفی شده است. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸، ۸۶۱۰۰۰ نفر در اثر ابتلا به سرطان کولورکتال فوت شده‌اند. همچنین سالانه ۱/۸ میلیون مورد جدید ابتلا به این سرطان تشخیص داده می‌شود (۱). سرطان کولورکتال با تغییر پاتولوژیک اپی‌تلیوم سالم ناحیه کولون و رکتوم به پولیپ‌های آدنوماتوزی و در نهایت ایجاد یک کارسینومای مهاجمی، شکل می‌گیرد. تشکیل تومور و گسترش آن مرحله به مرحله و در اثر تجمع اختلالات ژنتیکی و اپی ژنتیکی صورت می‌گیرد. درمان استاندارد برای تومورهای قابل برداشت، جراحی می‌باشد که در بیماران با احتمال عود، با شیمی درمانی همراه می‌شود. این سرطان معمولاً از مراحل خوش‌خیم شروع شده و به کارسینومای بدخیم و متاستاز به مناطق دور می‌انجامد. پیش‌آگهی و بقاء بیماران با میزان نفوذ تومور به نواحی پیرامون، درگیری گره‌های لنفاوی و همچنین متاستاز ارتباط مستقیم دارد (۲ و ۳).

lncRNA ها RNAهای غیرکدکننده با طول بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند (۴ و ۵). طی سال‌های اخیر، شمار شگفت‌آوری از lncRNAها شناسایی شده‌اند که از طریق توالی‌های ویژه‌ای با نواحی تنظیم‌کننده رونویسی ژن‌ها برهمکنش داشته و به این ترتیب در تنظیم بیان حداقل ۸۰ درصد ژنوم پستانداران دخیل می‌باشند (۶ و ۷). lncRNAها فرایندهای مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله رونویسی، ترجمه، تغییرات کروماتینی، چرخه سلولی، تمایز سلولی، مسیرهای سیگنالینگ آنکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور در سرطان‌ها را کنترل می‌کنند (۸). بر همین اساس به نقش lncRNAها در بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله سرطان توجه زیادی شده است (۹ و ۱۰).

اخیراً lncRNA جدیدی به نام *Lnc-OCI* (lncRNA associated with ovarian cancer 1 LOC100288181) شناسایی شده است که به عنوان یک RNA اندوژن رقابتی (ceRNA-competing endogenous RNA) عمل می‌کند و با اتصال به miR-34a/c اثرات سرکوبگر توموری این میکرو RNA را مهار

می‌کند. بدین ترتیب *Lnc-OCI* به عنوان یک آنکوژن عمل کرده و منجر به توسعه و پیشرفت سرطان می‌شود. در مطالعه Cho نشان داده شده که در سرطان تخمدان بیان *Lnc-OCI* به طور معنی داری افزایش می‌یابد و مهار آن در شرایط آزمایشگاهی، سبب مهار پدیده‌هایی نظیر تکثیر سلولی، تشکیل کلنی، مهاجم و مهاجرت شده و بدین ترتیب از تومورزایی جلوگیری می‌کند (۱۱). همچنین در تحقیقی دیگر مشخص شده که *Lnc-OCI* با مهار miR-34a/c، تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی تخمدان را افزایش می‌دهد و به عنوان یک نشانگر بیولوژیکی تشخیصی بالقوه و یک هدف درمانی قدرتمند برای سرطان تخمدان محسوب می‌شود (۸).

miRNAها، RNAهای کوچک غیرکدکننده هستند که با اتصال به ناحیه 3-UTR mRNAها منجر به تخریب mRNA و یا مهار ترجمه آن‌ها می‌شوند. مطالعات اخیر نشان داده که miRNAها با الگوی‌های مشخص در تومورها بیان می‌شوند و از طریق اختلال در تنظیم بیان ژن‌های هدف، در تومورزایی، پیشرفت و متاستاز تومورها نقش دارند. miR-34a در بافت‌های مختلف از جمله تخمدان، بیضه، ریه، کلیه و بافت‌های معده - روده به عنوان یک سرکوبگر تومور یافت می‌شود و بیان آن در انواع سرطان‌ها از جمله سرطان کولون، سرطان پانکراس و سرطان ریه کاهش می‌یابد (۱۲). یکی از ژن‌های هدف miR-34a ژن *SIRT1* است. ژن *SIRT1* (silent information regulator 1) بیان‌کننده پروتئین داستیلاز وابسته به NAD به نام سیرتوئین است که داده‌های متناقضی در ارتباط با نقش آن به عنوان آنکوژن یا ژن سرکوبگر تومور وجود دارد. از یک طرف بیان این ژن در تومورها و رده سلول‌های سرطانی افزایش می‌یابد که با مهار آپاپتوز و کاهش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور مثل p53 همراه است به همین دلیل به عنوان آنکوژن معرفی می‌شود و از طرف دیگر به عنوان یک پروتئین القاکننده آپاپتوز و مهارکننده تکثیر سلولی عمل می‌کند و در نتیجه رفتار سرکوبگر توموری از خود نشان می‌دهد (۱۳). به طور کلی می‌توان گفت سیرتوئین در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو و ژنوتوکسیک فرایند آپاپتوز را تنظیم می‌کند (۱۴). به عنوان مثال در سال ۲۰۰۸ دانشمندان اظهار داشتند

محلول RNA Lateral غوطه‌ور شده و به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه و سپس در دمای ۲۰- درجه فریز شدند. به منظور استخراج RNA تمام از ترايزول (Invitrogen) مطابق پروتکل استفاده شد سپس RNA استخراج شده از لحاظ کیفی و کمی بررسی شد. به منظور بررسی کمی RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo ۲۰۰۰) میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ اندازه گیری شد (محدوده غلظت RNAها ۲-۱/۸ بود). همچنین برای بررسی کیفی، RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. در ادامه به منظور حذف آلودگی احتمالی RNA استخراج شده به DNA ژنومی، هر نمونه RNA استخراج شده با آنزیم *DNaseI* (سیناژن) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تیمار شد. سپس به منظور خنثی‌سازی آنزیم *DNaseI* هر نمونه با ۱ میکرولیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در نهایت با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و پرایمر ۶ نوکلئوتیدی تصادفی، طبق پروتکل کیت، cDNA هر نمونه سنتز شد.

پرایمرهای اختصاصی

به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن، پس از طراحی با نرم افزار الیگو ورژن ۷ و BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، توسط شرکت پیشگام سنتز شد. ژن GAPDH به دلیل تغییرات بیان بسیار ناچیز در بافت کولورکتال به عنوان ژن خانه‌داری بررسی شد. در جدول شماره ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش

که به دلیل عملکرد ضد آپوپتوزی ممکن است این ژن در شیوع سرطان در انسان نقش داشته باشد (۱۳ و ۱۶). یا در تحقیق دیگر دانشمندان اظهار داشتند که *SIRT1* از متاستاز سرطان جلوگیری می‌کند و اعلام داشتند که *SIRT1* نقش خود را از طریق تنظیم منفی بیان miR-15b-5p انجام می‌دهد (۱۷).

در mRNA 3-UTR *SIRT1* یک المنت پاسخ به miR-34a شناسایی شده و چندین مطالعه مستقل نشان داده که این miRNA با اتصال به 3-UTR *SIRT1* mRNA ترجمه mRNA را مهار کرده و بدین ترتیب میزان پروتئین سیرتوئین در سلول کاهش می‌یابد (۱۴).

با توجه به نقش *Lnc-OCI* در مهار miR-34a/c و به دنبال آن تومورزایی و تنظیم بیان ژن *SIRT1* توسط miR-34a در این مطالعه برای اولین بار میزان بیان ژن‌های *Lnc-OCI* و *SIRT1* به طور همزمان در بافت توموری سرطان کولورکتال در مقایسه با بافت سالم بررسی شد.

روش کار

نوع مطالعه، نمونه‌گیری و استخراج

در مطالعه مورد-شاهدی حاضر، از بافت توموری ۳۵ فرد مبتلا به سرطان کولورکتال (از کلینیک پورسینای حکیم در شهرک سلامت) و بافت سالم کولون هر شخص، نمونه‌گیری انجام شد. معیارهای ورود به تحقیق گروه سنی بین ۲۹ تا ۸۷ سال، دارا بودن پرونده پزشکی، دریافت تشخیص سرطان کولورکتال و معیارهای خروج از تحقیق، تومورهای ثانویه کولورکتال و عدم رضایت به شرکت در این تحقیق بود. همه نمونه‌های بافتی (توموری و سالم) توسط پاتولوژیست، بررسی و طبق معیارهای گزارش شده، مورد تایید قرار گرفتند. نمونه‌های بافت بلافاصله پس از جراحی درون

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش RT-qPCR

| پرایمر | توالی پرایمر | دمای اتصال | سایز باند |
|----------------|---|------------|-----------|
| <i>SIRT1</i> | F: 5'-TAATTCCAAGTTCCATACC-3' R: 5'-ATTCACCACCTAACCTAT-3' | ۶۱/۵ °C | ۱۴۱ bp |
| <i>Lnc_OCI</i> | F: 5'-TAGTAGTAACACAGTAGCCTAT-3' R: 5'-AACACAGAGCAGATATTGG-3' | ۶۲ °C | ۱۷۴ bp |
| <i>GAPDH</i> | F: 5'-CCACTCCTCCACCTTTGACG-3' R: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' | ۵۸ °C | ۱۲۱ bp |

RT-qPCR آورده شده است.

RT qPCR برای ژن‌های مورد نظر و ژن خانه داری به صورت دو تکرار و به همراه یک واکنش کنترل منفی برای هر ژن صورت گرفت. پس از محاسبه $\Delta\Delta CT$ نسبت بیان ژن هدف در نمونه مورد نظر (بیمار) نسبت به نمونه کنترل (سالم) با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (۱۸-۲۰).

تکنیک RT-PCR

در این مطالعه جهت بررسی صحت سنتز cDNA از تکنیک PCR استفاده شد. برای انجام تکنیک PCR، ۶/۲۵ میکرولیتر PCR Master Mix (یکتاتجهیز آزما)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۲۵)، در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر (با آب مقطر استریل) تهیه و مخلوط شد. در ادامه با برنامه دمایی: فعال سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، برای اتصال آغازگرها در دمای مناسب (بهترین دما برای انجام PCR برای ژن *GAPDH* ۵۸ درجه سانتی گراد بود) به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولیل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر انجام شد و در نهایت روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز انجام شد.

روش‌های آماری

برای آنالیز داده‌ها از نرم افزارهای GraphPad Prism (۲۱-۲۳) و Excel استفاده شد و پس از تایید نرمال بودن حجم نمونه با آزمون Shapiro جهت بررسی اختلاف بیان ژن‌ها در بافت توموری بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و بافت سالم از آزمون T-test استفاده شد. برای مقایسه بیان ژن‌ها در مراحل مختلف از آزمون one way ANOVA استفاده شد. همچنین برای بررسی همبستگی بیان ژن‌های مورد نظر در این پژوهش از آزمون pearson استفاده شد. لازم به ذکر است که در تمام محاسبات آماری انجام شده *p* value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

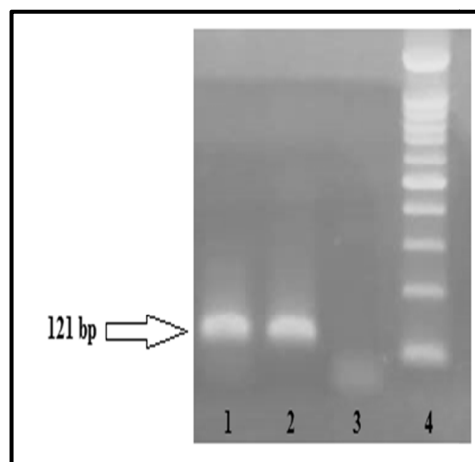
تکنیک Real Time – RTqPCR

در این مطالعه از تکنیک Real Time – RT qPCR (دستگاه Corbett rotor gene 6000) به منظور سنجش کمی سطح بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد. برای انجام این تکنیک از SYBR Green (یکتاتجهیز آزما) استفاده شد. لازم به ذکر است که واکنش Real Time

یافته‌ها

نتایج کمی و کیفی مربوط به RNA و صحت سنتز cDNA

در بررسی کیفی RNAهای استخراج شده مشاهده باندهای ۲۸ s rRNA، ۱۸ s rRNA و ۵/۸ s rRNA



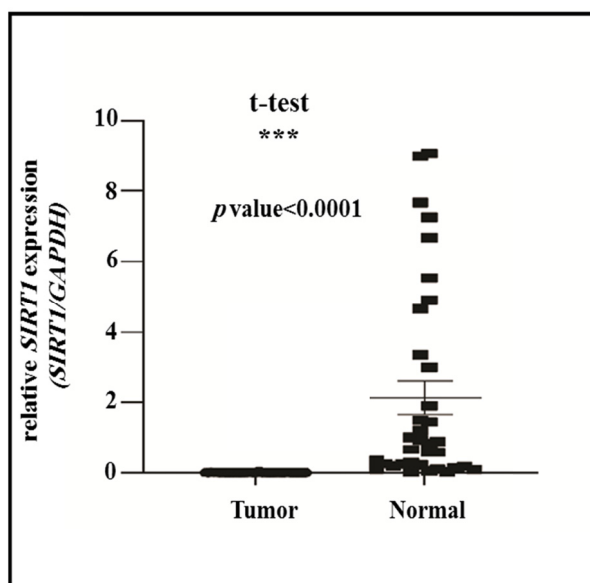
شکل ۱- بررسی صحت سنتز cDNA. حضور باند ۱۲۱ bp در چاهک شماره یک و دو نشان دهنده صحت سنتز cDNA می‌باشد، چاهک شماره ۳ کنترل منفی و چاهک شماره ۴ DNA ladder 100 bp را نشان می‌دهد.

مقایسه بیان ژن‌ها در بافت توموری و سالم

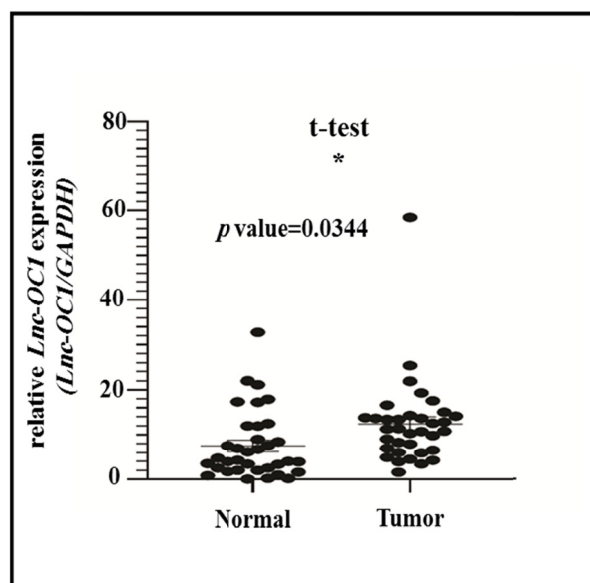
همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، سطح بیان ژن *SIRT1* بطور معنی‌داری در نمونه‌های توموری کولون در مقایسه با بافت سالم کاهش یافته بود ($p \text{ value} < 0.0001$) در حالی که سطح بیان ژن *Lnc-OCI* در بافت توموری به طور معناداری بیشتر از بافت نرمال بود ($p \text{ value} = 0.03$). (نمودار ۲).

سپس به منظور بررسی همبستگی بیان ژن *SIRT1* و *Lnc-OCI* بررسی وضعیت توزیع داده‌ها با استفاده از

نشان دهنده کیفیت مناسب RNA می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌ها پس از RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن خانه داری، که به منظور بررسی صحت سنتز cDNA انجام شد، در شکل ۱ مشاهده می‌شود. همان‌طور که انتظار می‌رفت وجود باند ۱۲۱ bp نشان دهنده صحت سنتز cDNA از نمونه‌های RNA می‌باشد.



نمودار ۱- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *SIRT1* در بافت‌های توموری و سالم. کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن *SIRT1* در نمونه‌های توموری در مقایسه با بافت سالم ($p \text{ value} < 0.0001$).

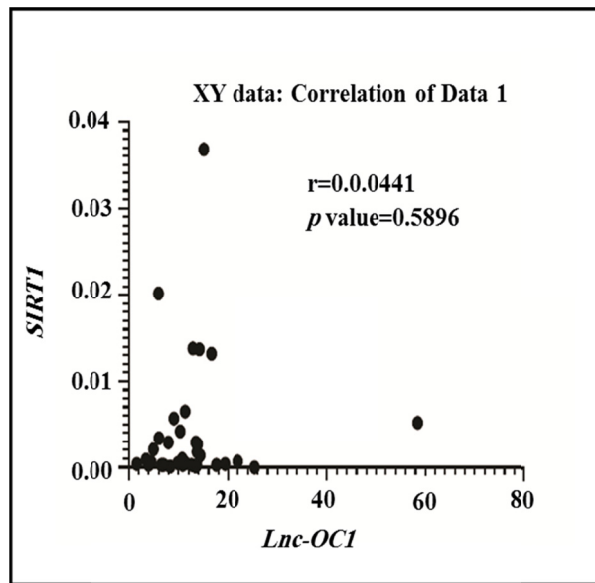


نمودار ۲- مقایسه میزان بیان نسبی ژن *Lnc-OCI* در بافت‌های توموری و سالم. افزایش معنی‌دار بیان نسبی ژن *Lnc-OCI* در بافت توموری در مقایسه با بافت سالم ($p \text{ value} = 0.03$).

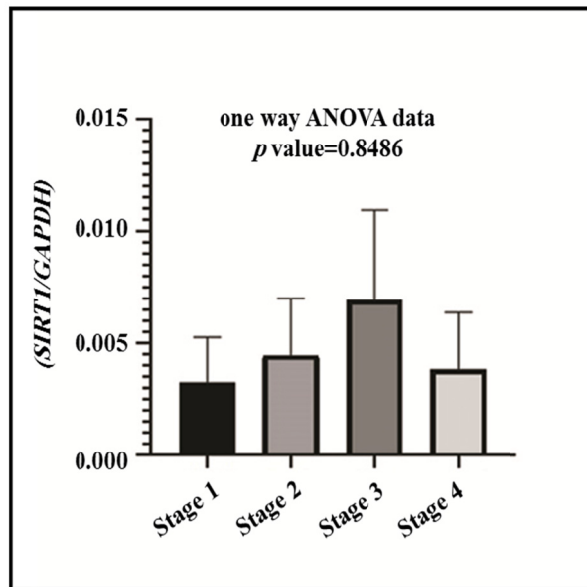
بررسی و مقایسه بیان ژن‌ها در *stage*های مختلف بافت‌های توموری

در این مطالعه، سطح بیان ژن *SIRT1* (نمودار ۴) و *Lnc-OCI* (نمودار ۵) در *stage*های مختلف بیماری در بافت‌های توموری با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تجزیه و تحلیل شد. نتایج این آنالیز نشان داد که سطح بیان این ژن‌ها در *stage*های مختلف بیماری تغییر معنی‌داری ندارد.

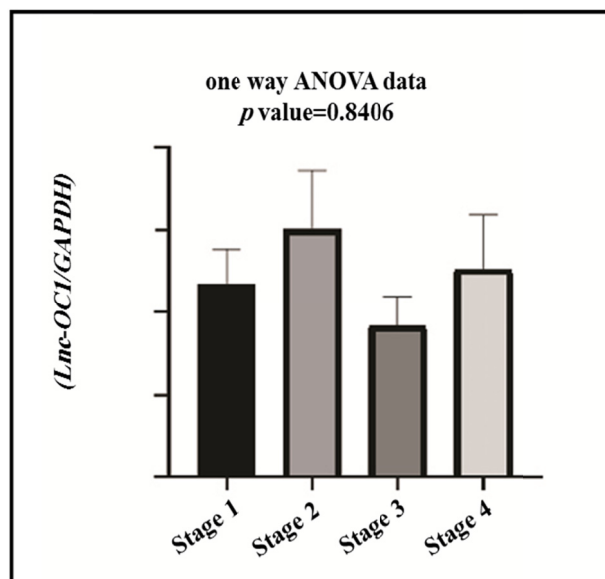
آزمون Shapiro Wilk نشان داد که توزیع داده‌ها به صورت نرمال نمی‌باشد ($p \text{ value} > 0.05$). به همین دلیل برای مقایسه میانگین بیان این ژن در بافت‌های توموری و نرمال از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. همانطور که در نمودار ۳ نمایش داده شده است، نتایج نشان داد که اگرچه بیان این دو ژن در بافت توموری، همبستگی مثبت دارند ($R=0.09441$) اما این همبستگی بیانی، معنی‌دار نیست ($p \text{ value} > 0.05$).



نمودار ۳- همبستگی بیانی *Lnc-OCI* و *SIRT1* در بافت‌های توموری



نمودار ۴- مقایسه بیان *SIRT1* در *Stage*های مختلف بیماری در بافت‌های توموری



نمودار ۵- مقایسه بیان Lnc-OC1 در Stage های مختلف بیماری در بافت‌های توموری

منحنی ROC برای SIRT1 نشان داد که SIRT1 نیز توانایی به کار گیری به عنوان یک عامل ارزیابی برای بررسی تمایز بافت‌های توموری و سالم را دارد ($p \text{ value} < 0.001$) که در نمودار ۷ نشان داده شده است.

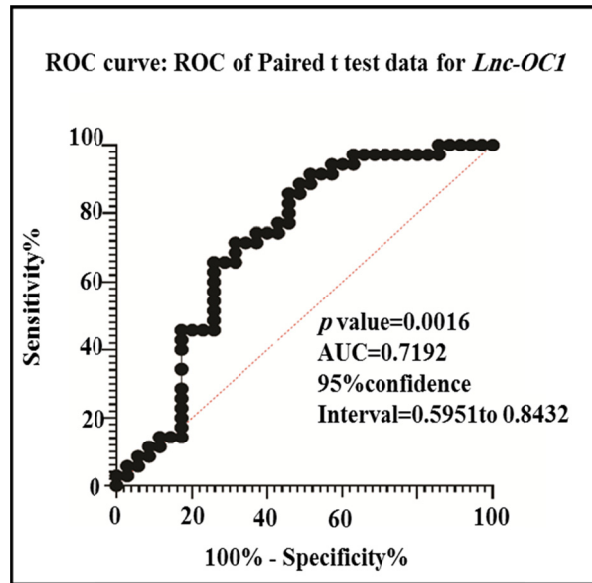
بحث

اگرچه نرخ بالایی از مرگ و میر در سرطان کولورکتال گزارش شده است اما هنوز فاکتورهای کلیدی در جنبه‌های مختلف این بیماری ناشناخته مانده است (۱۷). در این مطالعه نشان داده شد که در بافت‌های توموری مبتلایان به سرطان کولورکتال در مقایسه با بافت سالم، بیان ژن SIRT1 کاهش و بیان ژن Lnc-OC1 افزایش می‌یابد. به عبارتی ژن SIRT1 به عنوان سرکوبگر تومور و Lnc-OC1 به عنوان انکوژن عمل می‌کند.

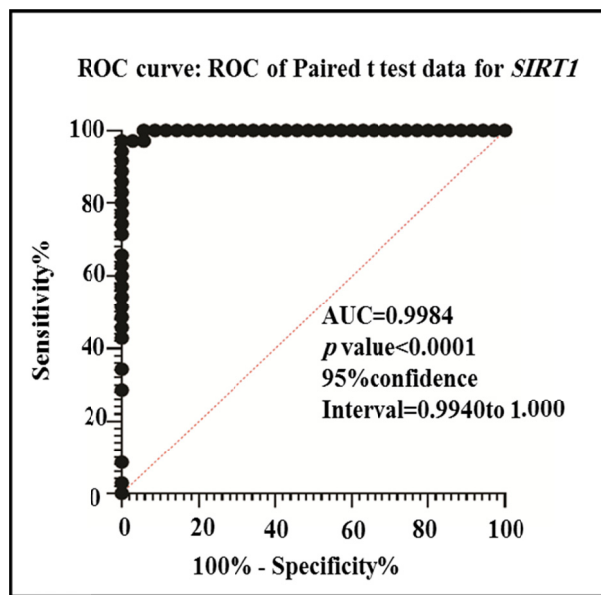
در حال حاضر میزان بیان ژن Lnc-OC1 تاکنون در سرطان کولورکتال و بسیاری از سرطان‌های دیگر، مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا سوابقی از آن در دسترس نمی‌باشد. تنها در یک مطالعه نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژن Lnc-OC1 در سال ۲۰۱۸ در سرطان تخمدان نشان داد که در بافت سرطانی تخمدان میزان بیان ژن Lnc-OC1 به شکل معنی داری افزایش می‌یابد و به عنوان انکوژن در تکثیر سلولی، تشکیل کلنی،

بررسی اختصاصیت و حساسیت ژن‌ها در سرطان کولورکتال

به منظور بررسی اختصاصیت و حساسیت هر یک از ژن‌های مورد نظر در این مطالعه، از آزمون ROC برای ترسیم ROC Curve استفاده شد. منحنی ROC یکی از ابزارهای مهم آماری برای بررسی میزان حساسیت و اختصاصیت فاکتورهای مورد بررسی در تشخیص و ایجاد تمایز بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد. به طور کلی هر چه میزان خیز نمودار ROC برای متغیر بیشتر باشد نشان دهنده کارایی بالاتر آن فاکتور در ارزیابی گروه‌های مورد بررسی است. امروزه دو عامل سطح زیر نمودار و فاکتور امتیاز دهی Youden به عنوان پارامترهای ارزیابی برای بررسی حساسیت و اختصاصیت فاکتورهای مورد بررسی در مطالعات زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طوری که هر چه سطح زیر نمودار و یا حد اکثر مقدار فاکتور Youdens بیشتر باشد کارایی فاکتور افزایش می‌یابد. نمودار ROC برای تغییرات بیان ژن SIRT1 و Lnc-OC1 نشان داد که ژن Lnc-OC1 می‌تواند به عنوان یک متغیر مستقل به صورت معنی داری ($p \text{ value} = 0.001$) میان دو گروه مورد مطالعه تمایز ایجاد نموده و به عنوان یک عامل پیشگویی کننده جهت ارزیابی احتمال بروز سرطان کولورکتال نقش ایفا نماید ($AUC = 0.7192$) که در نمودار ۶ نشان داده شده است. از سوی دیگر بررسی



نمودار ۶- اختصاصیت و حساسیت *Lnc-OCI* در سرطان روده در نمودار ROC. ژن *Lnc-OCI* می‌تواند به عنوان یک عامل پیشگویی کننده جهت ارزیابی احتمال بروز سرطان کولورکتال نقش ایفا کند.



نمودار ۷- اختصاصیت و حساسیت *SIRT1* در سرطان روده در نمودار ROC. *SIRT1* توانایی یک عامل ارزیابی برای بررسی تمایز بافت‌های توموری و سالم را دارد.

نقش دارد (۲۴ و ۲۵).

در این مطالعه با توجه به نقش *miR-34a/c* در مهار بیان ژن *SIRT1*، این انتظار وجود دارد که در بافت‌های توموری با افزایش بیان *Lnc-OCI* و به دنبال آن مهار *miR-34a/c*، بیان *SIRT1* افزایش یابد که با داده‌های این مطالعه همخوانی ندارد.

ژن *SIRT1* که اولین بار به عنوان ژن طول عمر معرفی شد، نقش مهمی در بیماری‌های مرتبط با سن

تهاجم و مهاجرت سلول‌های توموری نقش دارد (۸). در پژوهش حاضر نیز نتایج نشان داد که بیان ژن *Lnc-OCI* در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت سالم به صورت معنی داری ($p \text{ value} = 0.003$) افزایش یافته است. همچنین پیشنهاد شده که نقش آنکوژنی *Lnc-OCI* ناشی از مهار *miR-34a/c* می‌باشد (۱۴) و در نتیجه ژن‌های هدف *miR-34a/c* از جمله *SIRT1* را تحت تاثیر قرار می‌دهد که در تومورزایی و پیشرفت سرطان

نظر گرفته شود (۲۶). در سال ۲۰۱۹ Nie و همکاران اظهار داشتند که miR-34a و تاثیر آن بر روی بیان ژن *SIRT1* منجر به کاهش مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌گردد می‌تواند نقش مهمی در تشخیص بالینی و سرطان درمانی داشته باشد (۲۷). Yamakuchi و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که با افزایش miR-34a میزان *SIRT1* mRNA تغییر نمی‌کند بلکه ترجمه آن مهار می‌شود و میزان پروتئین *SIRT1* (سیرتوئین) کاهش پیدا می‌کند (۱۴). بر این اساس می‌بایست در مطالعات بعدی میزان پروتئین *SIRT1* و یا اهداف پایین دست *SIRT1* مثل p53 نیز بررسی شوند.

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر بیان ژن *Lnc-OC1* در بافت‌های توموری نسبت به بافت سالم به طور معنی‌داری افزایش یافته و بیان ژن *SIRT1* در بافت‌های سالم نسبت به بافت توموری کاهش معنی‌داری نشان داد و به نظر می‌رسد در سرطان کولورکتال افزایش بیان ژن *Lnc-OC1* با کاهش بیان ژن *SIRT1* همراه می‌شود که با تایید در مطالعات وسیعتر می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در سرطان کولورکتال مطرح باشد.

محدودیت‌ها و پیشنهادات

مهمترین محدودیت این مطالعه عدم همکاری برخی بیماران به علت کمبود انگیزه، امید نداشتن به بهبود شرایط و عدم اطمینان از عوارض نمونه‌برداری بود که امکان افزایش تعداد نمونه‌ها را با مشکل مواجه می‌کرد. با توجه به نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌شود میزان بیان ژن‌های *Lnc-OC1* و *SIRT1* در مراحل پیشرفت سرطان کولورکتال و سایر سرطان‌ها نیز بررسی گردد. همچنین با مقایسه بیان این ژن‌ها در لاین‌های سلولی سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال، عملکرد آنها نیز بررسی شود. همچنین باتوجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌شود میزان پروتئین *SIRT1* مدنظر قرار بگیرد.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با

مثل دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی - عروقی ایفا می‌کند. همچنین به دلیل عملکرد ضد آپوپتوزی ممکن است در شیوع سرطان در انسان نقش داشته باشد (۱۳). با این حال نقش این ژن در بیماری‌زایی و پیشرفت سرطان از جمله سرطان کولورکتال نامشخص و حتی متناقض است (۱۷). *SIRT1* در تومورهای بدخیم مختلف از جمله سرطان پستان، سرطان ریه و سرطان کولورکتال هم به عنوان فاکتور القا کننده تومور و هم سرکوبگر تومور معرفی شده است. این تناقضات این‌گونه توجیه شده است که در واقع نقش *SIRT1* در تومورزایی وابسته به سوپسترای آن در یک مسیر مشخص یا در یک نوع سرطان می‌باشد (۱۷). Firestein و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که *SIRT1* با داستیله کردن b-catenin (فرم غیر فعال) مانع ورود آن به هسته شده و فعالیت‌های transactivation آن را کاهش می‌دهد. بدین ترتیب *SIRT1* با تنظیم b-catenin نقش سرکوبگر توموری در سلول‌های سرطان کولورکتال ایفا می‌کند و از پیشرفت سرطان کولورکتال جلوگیری می‌کند (۱۳). همچنین در سال ۲۰۱۶ مشخص شد فعال کردن *SIRT1* با داروی resveratrol، مسیر NF- κ B را در سلول‌های سرطان کولون مهار می‌کند و اهداف پایین دست آن (MMP-9, CXCR4) که در تهاجم و متاستاز نقش دارند کاهش می‌یابند. در همین راستا در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد که *SIRT1* با داستیله کردن پروتئین AP-1 (پروتئین فعال کننده رونویسی) بیان miR-15b-5p را مهار کرده و بدین ترتیب میزان آنزیم پراکسیزومی استیل کوآنزیم A اکسیداز ۱ افزایش می‌یابد که منجر به کاهش مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۷). نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر همپوشانی دارد و تایید کننده نقش سرکوبگر توموری *SIRT1* در سلول‌های سرطان کولورکتال می‌باشد. در سال ۲۰۱۹ Chosokabe و همکاران با بررسی بیان ژن *SIRT1* نشان دادند که سرکوب بیان ژن *SIRT1* توسط siRNA منجر کاهش رشد و تکثیر سلول، مهار مهاجرت و تهاجم سلول می‌شود. همچنین بیان *SIRT1* در آنژیوسارکوم بیشتر از آنژیوم است و ممکن است در تکثیر و تهاجم آنژیوسارکوم نقش داشته باشد و ممکن است در آینده یک هدف برای درمان آنژیوسارکوم در

Res. 2017;77(15):3965-81.

11. Cho S-H, Jeon J, Kim SI. Personalized medicine in breast cancer: a systematic review. *J Breast Cancer*. 2012;15(3):265-72.

12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

13. Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One*. 2008;3(4).

14. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceed Natl Acad Sci*. 2008;105(36):pp. 13421-6.

15. Ren NS, Ji M, Tokar EJ, Busch EL, Xu X, Lewis D, et al. Haploinsufficiency of SIRT1 enhances glutamine metabolism and promotes cancer development. *Curr Biol*. 2017;27(4):483-94.

16. Qin J, Liu Y, Lu Y, Liu M, Li M, Li J, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-12.

17. Sun LN, Zhi Z, Chen LY, Zhou Q, Li XM, Gan WJ, et al. SIRT1 suppresses colorectal cancer metastasis by transcriptional repression of miR-15b-5p. *Cancer Lett*. 2017;409:104-15.

18. Vester D, Lagoda A, Hoffmann D, Seitz C, Heldt S, Bettenbrock K, et al. Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A virus transcription and replication dynamics. *J Virol Methods*. 2010;168(1-2):63-71.

19. Ferns R, Nastouli E, Garson J. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. *J Virol Methods*. 2012;179(1):189-94.

20. Ling D, Salvaterra PM. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS One*. 2011;6(3).

21. Berkman SJ, Roscoe EM, Bourret JC. Comparing self-directed methods for training staff to create graphs using Graphpad Prism. *J Appl Behav Anal*. 2019;52(1):188-204.

22. Calliess T, Bauer K, Stukenborg-Colsman C, Windhagen H, Budde S, Ettinger M. PSI kinematic versus non-PSI mechanical alignment in total knee arthroplasty: a prospective, randomized study. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2017;25(6):1743-8.

23. Touret F, Gilles M, Barral K, Nougairède A, van Helden J, Decroly E, et al. In vitro screening of a FDA approved chemical library reveals potential inhibitors of SARS-CoV-2 replication. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-8.

24. Yuan JM, Shi XJ, Sun P, Liu JX, Wang W, Li M, et al. Downregulation of cell cycle-related

کد IR.IAU.SHK.REC.1399.037 به تصویب رسیده است.

تقدیر و تشکر

این پژوهش برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد به شماره مصوب ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۷۲۰۰۸ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است. بدین وسیله از تمام افرادی که در انجام این پژوهش یاری رساندند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Bahrami A, Houshyari M, Jafari S, Rafiei P, Mazandarani M, Hekmatdoost A, et al. Dietary patterns and the risk of colorectal cancer and adenoma: a case control study in Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019;12(3):217.

2. Zhao J, Sawo P, Rensen SS, Rouflart MM, Winstanley A, Vreuls CP, et al. Impact of chemotherapy-associated liver injury on tumour regression grade and survival in patients with colorectal liver metastases. *HPB*. 2018;20(2):pp. 147-54.

3. Ambe PC, Gödde D, Störkel S, Zirngibl H, Bönicke L. Extra nodular metastasis is a poor prognostic factor for overall survival in node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorec Dis*. 2018;33(4):403-9.

4. Wei MM, Zhou GB. Long non-coding RNAs and their roles in non-small-cell lung cancer. *Genom Proteom Bioinform*. 2016;14(5):280-8.

5. Achour C, Aguilo F. Long non-coding RNA and Polycomb: an intricate partnership in cancer biology. *Front Biosci (Landmark edition)*. 2018;23:pp. 2106.

6. Nitsche A, Stadler PF. Evolutionary clues in lncRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2017;8(1):e1376.

7. Nojima T, Tellier M, Foxwell J, de Almeida CR, Tan-Wong SM, Dhir S, et al. Deregulated expression of mammalian lncRNA through loss of SPT6 induces R-loop formation, replication stress, and cellular senescence. *Mol Cell*. 2018;72(6):970-84. e7.

8. Tao F, Tian X, Lu M, Zhang Z. A novel lncRNA, lnc-OC1, promotes ovarian cancer cell proliferation and migration by sponging miR-34a and miR-34c. *J Gene Genom*. 2018;45(3):137-45.

9. Wang H, Fu Z, Dai C, Cao J, Liu X, Xu J, et al. lncRNAs expression profiling in normal ovary, benign ovarian cyst and malignant epithelial ovarian cancer. *Sci Rep*. 2016;6:38983.

10. Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm. *Cancer*

۷۰

proteins in ovarian cancer line and cell cycle arrest induced by microRNA. *Int J Clin Experim Med*. 2015;8(10):18476.

25. Hwang CI, Matoso A, Corney DC, Flesken-Nikitin A, Körner S, Wang W, et al. Wild-type p53 controls cell motility and invasion by dual regulation of MET expression. *Proceed Natl Acad Sci*. 2011;108(34):14240-5.

26. Chosokabe M, Noguchi A, Hoshikawa M, Masuzawa M, Takagi M. SIRT1 expression is associated with cell proliferation in angiosarcoma. *Anticancer Resh*. 2019;39(3):1143-50.

27. Nie D, Fu J, Chen H, Cheng J, Fu J. Roles of microRNA-34a in epithelial to mesenchymal transition, competing endogenous RNA sponging and its therapeutic potential. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):861.