مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v16i4.2691

مقاله پژوهشی

ارزیابی تأثیر بیان افزایشی هومئودومین پروتئین TGIF2LX بر روی تغییرات بیان miRNAهای انکوژن در رده‌ی سلولی سرطان روده بزرگ SW1116

فاطمه عمرانی‌طبرستانی[۱]، ابوالفضل اکبری[۲*]، شهره زارع‌کاریزی[۳]، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌الهی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات کولورکتال، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۳- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، ورامین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۳، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۷/۱۸

چکیده

مقدمه: *پروتئین القا شونده توسط فاکتور رشد ترانسفورم‌کننده بتا مرتبط با X (TGIF2LX) به‌عنوان یک هومئودومین پروتئین و کورپرسور فاکتور رشد ترانسفورم‌کننده بتا (TGF-β)، تکثیر برخی سلول‌های سرطانی از جمله سرطان روده بزرگ را به‌واسطه‌ی برخی مسیرهای پیام‌رسانی تنظیم می‌کند. miRNAهای غیرکدکننده کوچک (micro RNA; miRNA) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مولکولی سرطان روده بزرگ شناخته می‌شوند که در فرآیندهای رشد، تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلولی نقش دارند. هدف از این مطالعه ارزیابی اهمیت بیولوژیکی پروتئین TGIF2LX و تأثیر آن بر میزان بیان miRNAهای انکوژن miR-34a، miR-20a و miR-21 در سلول‌های رده سرطانی روده بزرگ SW1116 بود.*

مواد و روش‌ها: *رده سلولی SW1116 انسان و رده سلولی ترانسفکت شده با cDNA کدکننده ژن TGIF2LX و بیان‌کننده افزایشی این فاکتور، در محیط کشت RPMI 1640 در شرایط مناسب کشت شدند. برای ارزیابی میزان حیات سلول‌ها در in vitro از آزمون MTT استفاده شد. پس از استخراج RNA از هر دو گروه سلولی و سنتز cDNA، تجزیه و تحلیل بیان miRNAها با استفاده از تکنیک qRT-PCR انجام شد.*

نتایج: *نتایج نشان داد بیان افزایشی TGIF2LX می‌تواند تکثیر رده سلولی SW1116 را کاهش دهد. تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد بیان افزایشی TGIF2LX می‌تواند سطح بیان miR-21 را به‌طور معناداری کاهش دهد (P=۰/۰۲۶). با این حال سطح بیان miR-34a (P=۰/۵۲) و miR-20a (P=۰/۴۸) در سلول‌های SW1116 ترانسفکت شده با TGIF2 LX در مقایسه با سلول‌های دستکاری نشده تغییر معناداری نشان نداد.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های ما شواهدی از مکانیسم‌های مولکولی را ارایه داد که هومئودومین پروتئین TGIF2LX می‌تواند با کاهش بیان miR-21 به‌عنوان سرکوب‌کننده تومور در سلول‌های سرطان روده بزرگ عمل کند. بنابراین، به‌طور بالقوه می‌توان این پروتئین را به‌عنوان یک گزینه امیدوارکننده برای استراتژی‌های درمانی مبتنی‌بر ژن در این سرطان مدنظر قرار داد.*

واژه‌های کلیدی: هومئودومین پروتئین، **TGIF2LX**، **miRNA**، ژن **Hox**، سرطان روده بزرگ، **SW1116**.

[*] **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات کولورکتال، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، خیابان نیایش، خیابان ستارخان، تهران، ایران، **تلفن:** ۰۲۱۶۶۵۵۴۷۹۰، **نمابر:** ۰۲۱۶۶۵۵۴۷۹۰،
Email: akbariia2006@gmail.com

ارجاع: عمرانی‌طبرستانی فاطمه، اکبری ابوالفضل، زارع‌کاریزی شهره، ستوده‌نژاد نعمت‌الهی فتاح. ارزیابی تأثیر بیان افزایشی هومئودومین پروتئین TGIF2LX بر روی تغییرات بیان miRNAهای انکوژن در رده‌ی سلولی سرطان روده بزرگ SW1116. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛۱۶(۴):۴۲-۳۵.

مقدمه

ژن‌های هومئوباکس یاهاکس (Homeobox; HOX genes)، شامل گروه بزرگی از فاکتورهای رونویسی با ردیف‌هایی از یک توالی ۱۸۳ نوکلئوتیدی هستند که کدکننده یک هومئودومین ۶۱ اسید آمینه‌ای با قابلیت اتصال به DNA و پروتئین‌های Polycomb می‌باشد. این مولکول‌ها از این طریق به‌عنوان فعال یا سرکوب‌کننده ژن‌های خاص عمل می‌کنند. این ژن‌ها بر اساس موقعیت ژنی، شباهت هومئودومین‌ها و توالی به‌طور مشخص در چهار گروه طبقه‌بندی می‌شوند. ثابت شده است که ژن‌های Hox در تنظیم فرآیندهای رشد و تکوین سلولی دخیل هستند (۱). در تحقیقات متعددی مشخص شده است که جهش یا بیان غیرطبیعی این ژن‌ها در تنظیم ژنتیکی و اپی ژنتیکی سرطان‌ها نیز نقش دارند. به‌طوری که تنظیم بیان ژن‌های مختلف Hox در طیف وسیعی از بدخیمی‌ها، از جمله سرطان روده بزرگ و ریه، براساس نوع و محل تومور، دچار اختلال شده است (۲).

فاکتورهای القا شونده توسط TG (TGIF) شامل خانواده‌ای از پروتئین‌های TALE-homeodomain است که دارای چندین عضو است. ژن‌های Hox این خانواده چهار پروتئین متناظر TGIF در انسان را رمزدهی می‌کنند که عبارتند از TGIF، TGIF2، TGIF2LY و TGIF2LX (۳). مطالعات قبلی بر روی سلول‌های کشت نشان داد پروتئین القا شونده توسط فاکتور رشد ترانسفورم‌کننده بتا مرتبط با X (TGIF2LX) به‌عنوان یک سرکوب‌کننده رونویسی عمل می‌کند و بیان ژن‌های فعال شده توسط فاکتور رشد بتا (TGF-β) را مختل می‌کند. علاوه بر این، نشان داده شده است که تنظیم بیان ژن TGIF2LX در رده‌های مختلف سلولی سرطان روده بزرگ دچار اختلال می‌شود. این هومئودومین پروتئین در سلول‌های سرطانی مختلف موجب تنظیم بیان ژن‌های مسیر پایین دست و فرآیندهای سلولی متناظر از جمله آپوپتوز، سیکل سلولی، تمایز و پرولیفراسیون سلولی می‌شود (۱).

پیچیدگی تنظیم بیان ژن‌های Hox و مسیرهای پیام‌رسانی متناظر حاکی از وجود تعداد زیادی توالی RNA غیرکدکننده (non-coding RNA; ncRNA) حفاظت شده در لوکوس‌های مربوطه می‌باشد. به گونه‌ای که تعدادی از ncRNA های واقع در شبکه ژنی Hox مسئول تنظیم رویدادهای اپی ژنتیکی و ساختار کروماتین هستند (۴). در میان ncRNAها، RNAهای غیرکدکننده طویل (long non-coding RNA; lncRNA) و کوتاه (microRNA; miRNA) به‌عنوان افکتورهای بیولوژیک مهم در شروع و پیشرفت سرطان شناخته شده‌اند (۵ و ۶). اصلاح کروماتین به‌عنوان یک فرآیند متمایز پس از رونویسی شناخته شده است که در آن ژن‌های Hox می‌توانند ncRNA های مرتبط با سرطان را تنظیم کنند. علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که بین ژن‌های Hox و ncRNA ها در شرایط in vitro و in vivo اثرات متقابل وجود دارد.

علاوه بر این، ژن‌های Hox در کلاسترهایی قرار گرفته‌اند که حاوی ژن‌هایی برای رونویسیncRNA ها هستند (۷ و ۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که اختلال در تنظیم تعامل بین ژن‌های Hox و ncRNAها از جمله miRNAها می‌تواند در سطوح دیگر بیان ژن منعکس شده و موجب رشد بی‌رویه سلولی و ایجاد سرطان شود. این سناریو نیز مطرح است کهncRNAها می‌توانند نقش میانجی را ایفا کنند (۹ و ۱۰). از طرفی مجموعه ای از شواهد نشان می‌دهند که miRNA ها با تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی کلیدی در سرطان‌زایی سرطان روده بزرگ ارتباط داشته و به این ترتیب در ایجاد تومور دخیل هستند. نقش تنظیمی miRNA ها در ژنتیک و اپی ژنتیک سرطان می‌تواند با عملکرد آنها به‌عنوان یک واسطه در تعامل‌های ژن–miRNA و یا پروتئین–miRNA مرتبط باشد (۱۱ و ۱۲). با توجه به عملکردهای شناخته شده TGIF2LX در فرآیندهای شروع و پیشرفت سرطان، نقش بیولوژیک آن در مکانیسم سرطان‌زایی به‌واسطه ncRNAها در سرطان روده بزرگ مشخص نیست. از سوی دیگر، درک مکانیسم‌های مولکولی ایجاد سرطان‌ها به‌واسطه ncRNA ها و تنظیم ژن‌های Hox (و یا تعامل متقابل بین آنها) بینش مفیدی در مورد ایجاد و پیشرفت سرطان ارایه می‌دهد. این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر بیان افزایشی پروتئین TGIF2LX بر روی تغییرات بیان miRNAهای انکوژن (miR-21, miR-20a, miR-34a) در سلول‌های سرطان روده بزرگ انجام شد.

مواد و روش‌ها

رده سلولی آدنوکارسینوم روده بزرگ انسانی، SW1116، از بانک ملی سلول‌های ایران (مؤسسه پاستور تهران، ایران) تهیه شد. سلول‌های SW1116 که در مطالعه‌ی قبلی ما با کلون‌های پلاسمید حاوی cDNA کدکننده پروتئین TGIF2LX (SW1116-TGX) و پلاسمید حاوی GFP و فاقد ژن TGIF2LX (SW1116-Mock) ترانسفکت شده بود نیز تهیه و آماده کشت شد (۱۳). لازم به ذکر است تمام آزمون‌های تأییدی از لحاظ بیان فاکتور TGIF2LX در سطح ژن و پروتئین (از جمله مشاهده ویژگی‌های ماکروسکوپیک، RT-PCR و وسترن بلاتینگ) بر روی سلول‌های ترانسفکت شده انجام و بیان فاکتور در سلول‌ها مورد تأیید قرار گرفت (۱۳).

تمام سلول‌ها (اعم از ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی ژن pTGIF2LX- EGFP و فاقد ژن pEGFP-N1) در محیط کشت کامل RPMI-1640 حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین و سرم جنین گاوی (Gibco) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵٪ و CO2 ۵٪ در انکوباتور کشت شد. زمان دو برابر شدن سلول براساس شرایط آزمایشگاهی در این مطالعه ۳۶ ساعت تعیین شد. با توجه به تکثیر سلولی پس از حدود ۲۴ تا ۴۸ ساعت سلول‌ها پاساژ داده شد. به این منظور محیط کشتی را که در اثر متابولیسم سلولی تغییر رنگ داده (متمایل به رنگ زرد

شده) و اسیدی شده از فلاسک سلولی خارج کرده و برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک از تریپسین (غلظت ۰/۲۵٪) استفاده شد. شمارش سلول‌های زنده در پلیت‌ها (SPL; Life Science، South Korea) با تریپان بلو انجام شد.

تست MTT و بررسی حیات سلولی

اثر مهارکنندگی فاکتور TGIF2LX بر روی فعالیت متابولیکی و حیات سلول‌های SW1116 به‌وسیله تعیین میزان جذب تیازولیل بلو تترازولیوم بروماید (MTT assay, Sigma Aldrich) در سلول‌های زنده بررسی شد. سلول‌هاش زنده‌ی شمارش شده در پلیت‌های ۹۶ تایی با تراکم ۵۰۰۰ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر Well کاشته شد. حیات سلول‌های ترانسفکت شده با فاکتور TGIF2LX در روزهای ۱ و ۲ و ۳ و ۴، با آزمون ارزیابی حیات سلولی ارزیابی شد. در هر یک از این روزها، سلول‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر از MTT برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سلول‌های ترانسفکت نشده با ژن (ترانسفکت شده با پلاسمید خالی از ژن هدف یا pEGFP-N1) نیز به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پس از آنکه رسوب formazan در ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO حل شد، دنسیتومتری نوری در طول موج ۵۷۸ nm انجام شد. میزان مهارکنندگی حیات سلولی یا IR توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$IR\ (\%)=1-\ ODexp/ODcon\times100$$

که در اینجا ODexp و ODcon به‌ترتیب اعداد دنسیتومتریک نوری مربوطبه سلول‌های ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده است.

در این مطالعه جهت تکثیر miRNA ها از تکنیک Real-Time PCR و کیت MiR-Amp kit شرکت پارس ژنوم (PARSGENOME, Tehran) استفاده شد. افزودن یک دم polyA به miRNAهای موردنظر یکی از شیوه‌های بررسی بیان miRNAهاست که در این کیت نیز از همین روش برای تکثیر miRNA ها بهره گرفته شده است. روش تکثیر miR با استفاده از این کیت شامل یک پروتکل سه مرحله‌ای به شرح زیر می‌باشد:

الف- مرحله افزودن آنزیم PolyA Polymerase و پلی آدنیلاسیون

ب- سنتز رشته اول cDNA

ج- تکثیر به روش Real-Time PCR

الف) مرحله افزودن آنزیم PolyA Polymerase و پلی آدنیلاسیون

نام ماده	حجم(µl)	غلظت/مقدار نهایی
10x reaction buffer	۲	
ATP	۲	۱۰mM
Poly A enzyme	۰/۵	
RNA		۱/۵-۲ µg
Total volume (by DEPC treated water)	۲۰	

به‌منظور پلی آدنیلاسیون و اضافه شدن دم پلی A به انتهای توالی RNAهای کوچک، تمامی مواد فوق با کمک پیپت کردن به آرامی با یکدیگر مخلوط و اسپین شده و در دمای ۳۷ C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. محصول واکنش فوق در فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ب) سنتز رشته ی اول cDNA

نام ماده	حجم(µl)	غلظت/مقدار نهایی
5x reaction buffer	۲	
dNTP mix	۱	۱۰mM
RT enzyme	۰/۵	
miR cDNA Syn specific primer	۰/۵ each	۱۵ pmol
RNA poly A tail		up to 2 µg
Total volume	۱۰	

به‌منظور سنتز cDNA از روی RNA پلی آدنیله شده، مواد فوق به کمک پیپت کردن به آرامی با یکدیگر مخلوط و پس از اسپین شدن واکنش در دمای ۴۴°C به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. سپس به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم RT در دمای ۸۵°C به مدت ۱ دقیقه انکوبه شد. محصول واکنش در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد. طبق دستورالعمل کیت شود عمل رقیق‌سازی درست قبل از مرحله Real-time PCR انجام شده و cDNA به میزان موردنیاز با آب DEPC رقیق شد.

ج) تکثیر به روش Real-Time PCR

نام ماده	حجم(µl)	غلظت/مقدار نهایی
SYBR Green master mix	۱۰	
ROX DYE		
cDNA(diluted)	۷-۸	
Mix of miR specific primers	۱ each	۱۰ pmol
Total volume	۲۰	

پس از آنکه کارآیی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده به کمک رقیق‌سازی انجام و مورد تأیید واقع شد، مواد ذکر شده در جدول فوق با یکدیگر مخلوط شده و واکنش Real-Time PCR با SYBR Green انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

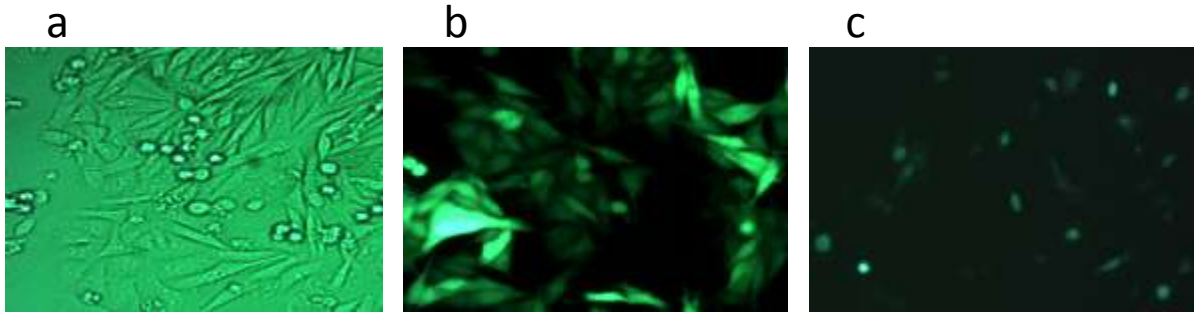
miRNA	Forward sequence (5′ → 3′)	Reverse sequence (5′ → 3′)
miR-21	TCAGTAGCTTATCAGACTG ATG	CGTCCAGTTTTTTTTTTTT TTTCAAC
miR-20a	ACAGTAAAGTGCTTATAGT GCA	GTCCAGTTTTTTTTTTTT TTCTACCT
miR-34a	GATAGTAAAGTACTTATAG TCGA	CTGGACTTTTTTTTTTTT TTCTAGCT

همه واکنش‌ها با سه بار تکرار انجام شد و سیکل آستانه (Ct) هر واکنش به‌دست آمد. سطوح بیان نسبی miRNAها به کمک بیان RNU6 به‌عنوان کنترل داخلی نرمالایز شد. داده‌ها با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بیان توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه SPSS Inc. 21.0 ، Chicago، IL، USA)

و با استفاده از آزمون یو من- ویتنی تجزیه و تحلیل شد. P<۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری برای آزمون آماری در نظر گرفته شد.

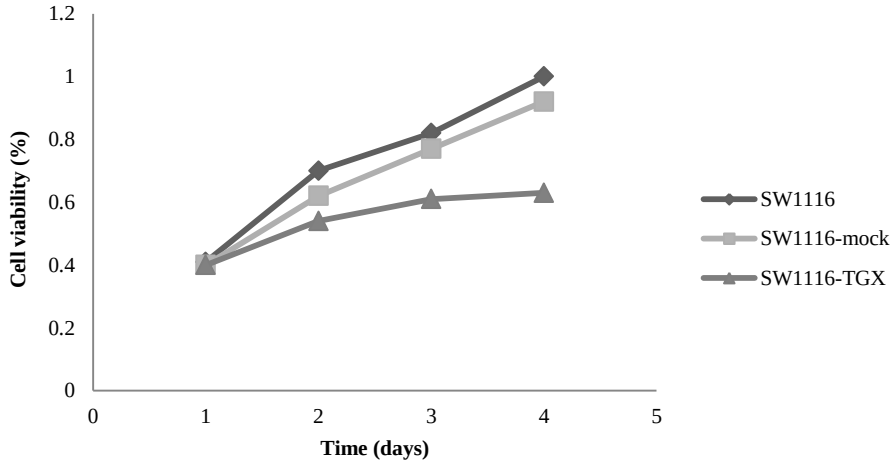
نتایج

با بررسی میکروسکوپیک سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی cDNA کدکننده ژن TGIF2LX و GFP به تنهایی با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت، کارایی ترانسفکشن سلول‌ها در سطح سلولی مجدد ارزیابی شد (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است بیان فاکتور TGIF2LX در هسته رخ می‌دهد. سلول‌های حاوی GFP و فاقد ژن هدف، این پروتئین فلورسنت سبز را در سیتوپلاسم بیان می‌کنند.



شکل ۱- شمای میکروسکوپی کشت سلول‌های SW1116

تصویر کشت سلول SW-1116 تحت بررسی میکروسکوپ نوری(a)، تصویر سلول‌هایSW-1116 بیان‌کننده GFP به تنهایی در سیتوپلاسم (b) و پروتئین TGIF2LX در هسته سلول (c) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت که بیانگر کارایی ترانسفکشن سلول‌ها می‌باشد.



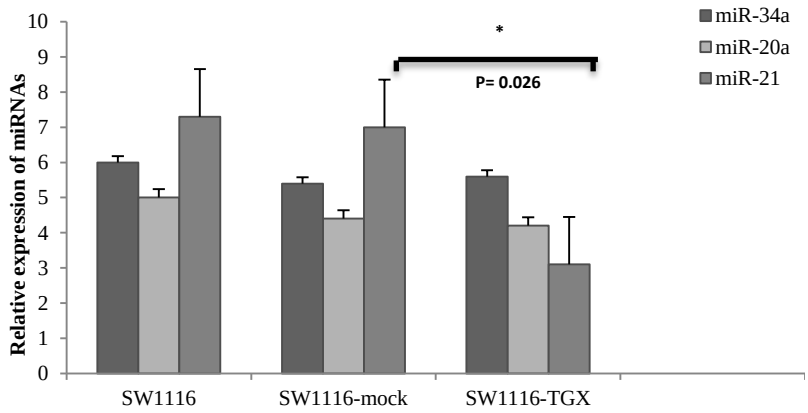
شکل ۲- ارزیابی رشد و تکثیر سلولی در سلول‌های SW1116 با بیان افزایشی TGIF2LX با استفاده از آزمون MTT

پس از گذشت ۴ روز از کشت سلولی، توانایی تکثیر سلولی در سلول‌های SW1116 ترانسفکت شده با TGIF2LX نسبت‌به سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور خالی از ژن TGIF2LX و همچنین سلول‌های ترانسفکت نشده، کاهش نشان داد (P<۰/۰۳۸).

نتایج آزمون MTT نشان داد، پس از گذشت ۴ روز از کشت سلولی حیات سلولی در سلول‌های SW1116 بیان‌کننده TGIF2LX نسبت به سلول‌های فاقد بیان این فاکتور به‌طور معناداری کاهش دارد (P<۰/۰۳۸). به این ترتیب که توانایی تکثیر سلولی در سلول‌های SW1116 ترانسفکت شده با TGIF2LX نسبت به سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور خالی از ژن TGIF2LX و همچنین سلول‌های ترانسفکت نشده، طی ۴ روز کشت سلولی کاهش نشان داد (شکل ۲).

با ارزیابی میزان بیان miRNAها در سلول‌های SW1116 بیان‌کننده‌ی TGIF2LX نسبت به سلول‌های فاقد بیان و ترانسفکت نشده SW1116، مشخص شد بیان افزایشی این فاکتور می‌تواند در میزان بیان miRNAها تغییر ایجاد کند. نتایج تجزیه و تحلیل بیان نشان داد، بیان miR-21 در سلول‌های SW1116 بیان‌کننده TGIF2LX نسبت به سلول‌های فاقد بیان این فاکتور به‌طور معناداری کاهش دارد (P<۰/۰۲۶). با این حال تغییرات بیان miR-20a (P<۰/۴۸) و miR-34a (P<۰/۵۲) در سلول‌های

SW1116 بیان‌کننده TGIF2LX نسبت به سلول‌های فاقد بیان این فاکتور تغییر قابل توجه و معناداری نشان نداد. در مجموع یافته بیانگر این بود که TGIF2LX می‌تواند بیان miR-21 را در سلول‌های سرطان روده بزرگ SW1116 کاهش دهد (شکل ۳).



شکل ۳- تغییرات بیان miRNAهای مورد مطالعه در اثر بیان افزایشی TGIF2LX در سلول‌های SW1116

بیان miR-21 در سلول‌های SW1116 بیان‌کننده TGIF2LX (SW1116-TGX) نسبت به سلول‌های فاقد بیان این فاکتور به‌طور معناداری کاهش دارد (P=۰/۰۲۶). با این حال تغییرات بیان miR-20a (P=۰/۴۸) و miR-34a (P=۰/۵۲) در سلول‌های SW1116 بیان‌کننده TGIF2LX نسبت به سلول‌های فاقد بیان این فاکتور تغییر قابل توجه و معناداری نشان نداد.

بحث

مجموعه‌ای از شواهد نشان داده است که بیان ناهنجار ژن‌های خانواده Hox می‌تواند در ایجاد تومور نقش داشته باشد. مشخص شده است که پروتئین‌های هومئودومین به‌عنوان عوامل رونویسی برای تنظیم رشد و تکثیر سلولی در سلول‌های مختلف بدن عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال، ژن CDX1 و سایر ژن‌های Hox انسانی می‌تواند چرخه سلولی را با تعدیل چند پروتئین نقاط کنترلی در سلول‌های روده تنظیم کند (۱۴ و ۱۵). پروتئین TGIF2LX به‌عنوان یک کورپرسور برای TGF-β مطرح بوده که موجب تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی پایین دستی می‌شود. سطح بیان ژن TGIF2LX، در چندین رده سلولی پستانداران در ارتباط معکوس با سطح بیان ژن‌های هدف مسیر پیام‌رسانی TGF-β و توقف رشد می‌باشد. شواهدی مبنی بر نقش کلیدی ژن TGIF2LX در تنظیم رشد سلول‌های انسان وجود دارد (۱ و ۳). اختلال در تنظیم و الگوی بیان این ژن‌ها در سرطان‌های مختلف گزارش شده است. چنانچه مشخص شده است که ۷۳/۵٪ از تومورهای پروستات حداقل یکی از ژن‌های TGIF2LX و TGIF2LY را بیان می‌کنند و یک همراهی بین بیان یکی از این دو ژن و ایجاد سرطان پروستات وجود دارد (۱۶). همچنین در مطالعه اولیه‌ای که ما بر روی بیان TGIF2LX در ده رده سلولی سرطان روده بزرگ انجام دادیم مشخص شد بیان ژن TGIF2LX در بیشتر رده‌های سلولی روده بزرگ بر اساس میزان تمایز یافتگی و پیشرفت سرطان کاهش نشان می‌دهد. از آنجایی که این ژن در رده سلولی SW1116 فاقد بیان بود، در مطالعه‌ی حاضر این رده سلولی جهت بررسی اثر بیان اکتوپیک و بررسی عملکرد آن انتخاب شد. اما این نکته قابل چشم‌پوشی نیست که برخی از ژن‌های Hox با مکانیسم‌های مولکولی مختلفی بر مسیرهای پیام‌رسانی سلولی تأثیر گذاشته و در هر رده سلولی ممکن است مکانیسم عمل آنها متفاوت باشد. ژن TGIF2LXمی‌تواند با توجه به وجود یا فقدان و تنوع پارتنرهای همراه و یا تغییرات پس از ترجمه ای که در رده‌های سلولی متفاوت و در سرطان‌های متفاوت وجود دارد، نقش دوگانه‌ای به‌عنوان سرکوبگر یا تقویت‌کننده‌ی توموری ایفا کند (۱۷ و ۱۸).

بیان TGIF2LXبه‌عنوان یک پروتئین هومئودومین و یک فاکتور رونویسی، در برخی از رده‌های سلولی سرطانی، از جمله روده بزرگ از دست رفته است، که به نفع نقش مهارکنندگی توموری و دخیل در هموستاز سلولی است. گزارش شده است که TGIF2LX می‌تواند تکثیر و رگ‌زایی تومورهای روده بزرگ را در شرایط in vitro و in vivo کاهش دهد. یافته‌ها نشان داده که پروتئین TGIF2LX می‌تواند از طریق تنظیم برخی از مسیرهای پیام‌رسانی سرطان‌زا به‌عنوان یک سرکوب‌کننده تومور عمل کند. مطالعات اخیر نشان داد که خانواده پروتئینی TGIF2 انسانی می‌توانند از طریق تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلول‌های سرطانی، تکثیر و اندازه تومور را کاهش دهد (۱ و ۳). مطالعه دیگری نشان داد که بیان افزایشی TGIF2LX می‌تواند موجب تنظیم کاهشی بیان Bcl2 و تنظیم افزایشی بیان Bax در سلول‌های سرطانی شود (۱۷). شواهدی نیز وجود دارد دال بر اینکه پروتئین‌های هومئودومین نقش مهمی در تقویت مرحله‌ی توقف G1-S در چرخه‌ی سلولی داشته و بیان P53 و Bcl2 را در سرطان‌ها تنظیم می‌کنند (۱۷). تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی بیشتر نشان داد که یک شبکه پیام‌رسانی پایین دست این پروتئین در پاتوژنز سرطان روده بزرگ نقش دارد (۱). miRNAها به‌عنوان یک گروه اصلی از ncRNAها شناخته می‌شوند که می‌توانند به‌عنوان عوامل سرطان‌زا و یا

سرکوب‌کننده تومور در ایجاد و پیشرفت سرطان ایفای نقش کنند. نشان داده شده است که این مولکول‌های کوچک RNA در فرآیندهای متعدد ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول دخیل هستند (۱۹ و ۲۰). مطالعات عملکردی و بیوانفورماتیک در زمینه‌ی بررسی تعاملات و شبکه ژنی سرطان نشان داده که بین miRNA و ژن‌های Hox به‌طور بالقوه تعامل (cross-talk) وجود دارد. این رویدادهای مولکولی متقابل بین Hox و miRNA می‌تواند تکثیر و تهاجم را در سلول‌های سرطانی تنظیم کند (۱۰، ۱۲، ۱۴). اگر چه اخیراً توجه زیادی به نقش miRNAهای مرتبط با سرطان شده است، اما عملکرد بیولوژیکی محور Hox -miRNA در ایجاد و پیشرفت سرطان به‌طور کامل شناخته نشده است.

با توجه به نقش بالقوه TGIF2LX در تومورزایی سرطان روده بزرگ، هدف ما از این مطالعه ارزیابی اثر بیولوژیک و مکانیسم‌های احتمالی سرکوبگر توموری آن بر بیان برخی miRNAهای انکوژن (miR-21، miR-20a و miR-34a) بود. یافته‌های مطالعه ما نشان داد که بیان افزایشی TGIF2LX می‌تواند سطح بیان miR-21 (و نه miR-34a و miR-20a) را در رده سلولی سرطان روده بزرگ SW1116 کاهش دهد. شواهد مطالعات متعدد بیانگر این است که miR-21 نقش مهمی در ایجاد تومورهای مختلف از جمله روده بزرگ ایفا می‌کند. گزارش شده است که میزان بیان miR-21 در تومورهای روده بزرگ در مقایسه با بافت‌های مجاور افزایش می‌یابد، که نشان‌دهنده عملکرد بالقوه انکوژنیک آن در ایجاد و پیشرفت سرطان است. miR-21 همچنین در تنظیم تکثیر و آپوپتوز سلولی در شرایط in vitro و in vivo نقش دارد (۲۱). در این راستا miR-21 با هدف گیری و مهار مسیرهای پیام‌رسانی سرکوبگر توموری PI3K و PTEN می‌تواند موجب افزایش تکثیر سلولی و با هدف قرار دادن FBOX11 و FasL موجب کاهش آپوپتوز می‌شود (۲۲). علاوه بر این، miR-21 در فرآیندهای متاستاز، آنژیوژنز و مقاومت دارویی در سرطان روده بزرگ نقش داشته و در ارتباط با پیشرفت سرطان می‌باشد (۲۳). نشان داده شده است که افزایش سطح بیان این miRNA در بیماران سرطان روده بزرگ در ارتباط با مرحله بالینی بیماری و بقای بیماران می‌باشد (۲۴ و ۲۵).

بر اساس یافته‌های ما، می‌توان استنباط کرد که TGIF2LX ممکن است با هدف قرار دادن چندین مسیر پیام رسانی از جمله miRNAهای انکوژن دخیل در تکثیر سلول‌های روده بزرگ نظیر miR-21 در تنظیم رشد سلولی نقش داشته باشد. با این حال، تحقیقات کاربردی و بیوانفورماتیکی بیشتری در راستای یافتن اهداف پایین دستی و تعامل بین ژن TGIF2LX و شبکه‌های تنظیم ncRNAها برای تأیید نقش سرکوبگر توموری این پروتئین ضروری است. این‌گونه مطالعات می تواند بینش ما را در مورد نقش محور Hox-miRNA در ایجاد و پیشرفت سرطان روده بزرگ بهبود بخشد. اگرچه داده‌های تجربی و in vitro مبنایی برای بررسی اولیه و مکانیسم تنظیم بیانmiRNAها و ژن‌های هدف کلیدی هستند، اما داده‌های in vivo و بالینی بیشتری برای اعتبارسنجی نتایج ضروری است.

نتایج حاضر تا حدی از نقش سرکوبگر توموری ژن TGIF2LX در سرطان روده بزرگ از طریق تعامل با RNAهای غیرکدکننده و تنظیم بیان آنها حمایت می‌کند. یافته‌های ما شواهدی از مکانیسم‌های مولکولی را ارایه می‌دهد که پروتئین TGIF2LX و مسیرهای پیام‌رسان پایین دست می‌تواند با کاهش بیان miR-21 نقش یک سرکوبگر تومور را در سلول‌های سرطان روده بزرگ ایفا کند. بنابراین، می‌توان این پروتئین را به‌طور بالقوه به‌عنوان یک گزینه امیدوارکننده برای استراتژی‌های درمانی مبتنی‌بر ژن در سرطان روده بزرگ مدنظر قرار داد.

تشکر و قدردانی

پروژه حاضر با شماره گرنت ۱۴۰۰-۲-۴۹-۲۱۴۳۱ مورد حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران قرار گرفته است. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Akbari A, Agah S, Heidari M, Mobini GR, Faghihloo E, Sarveazad A, et al. Homeodomain protein transforming growth factor beta-induced factor 2 like, X-linked function in colon adenocarcinoma cells. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP 2017;18:2101. doi:10.22034/APJCP.2017.18.8.2101
2. Li B, Huang Q, Wei G-H. The role of HOX transcription factors in cancer predisposition and progression. Cancers 2019;11:528 . doi:10.3390/cancers11040528
3. Mobini GR, Ghafari A, Amanpour S, Fateh R, Ghahremani MH, Muhammadnejad S, et al. In vivo identification of novel TGIF2LX target genes in colorectal adenocarcinoma using the cDNA-AFLP method. Arab Journal of Gastroenterology 2018;19:65-70. doi:10.1016/j.ajg.2018.05.001
4. Heubach J, Monsior J, Deenen R, Niegisch G, Szarvas T, Niedworok C, et al. The long noncoding RNA HOTAIR has tissue and cell type-dependent effects on HOX gene expression and phenotype of urothelial cancer cells. Molecular Cancer 2015;14:1-17 . doi:10.1186/s12943-015-0371-8
5. Jothimani G, Sriramulu S, Chabria Y, Sun X-F, Banerjee A, Pathak S. A review on theragnostic applications of microRNAs and long non-coding RNAs in colorectal cancer. Current topics in medicinal chemistry. 2018;18:2614-29 . doi:10.2174/1568026619666181221165344
6. Talebi A, Azizpour M, Agah S, Masoodi M, Mobini GR, Akbari A. The relevance of long noncoding RNAs in colorectal cancer biology and clinical settings. Journal of Cancer Research and Therapeutics 2020;16:S22-S3 .doi:10.4103/jcrt.JCRT_327_18
7. Li L, Wang Y, Song G, Zhang X, Gao S, Liu H. HOX cluster-embedded antisense long non-coding RNAs in lung cancer. Cancer Letters 2019;450:14-21 .doi:10.1016/j.canlet.2019.02.03
8. Botti G, De Chiara A, Di Bonito M ,Cerrone M, Malzone MG, Collina F, et al. Noncoding RNAs within the HOX gene network in tumor pathogenesis and progression. Journal of Cellular Physiology 2019;234:395-413 .doi:10.1002/jcp.27036

9. Severino P, Brüggemann H, Andreghetto FM, Camps C, Klingbeil MdFG, de Pereira WO, et al. MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation. BMC Cancer 2013;13:1-15 .doi:10.1186/1471-2407-13-533

10. Padam KSR, Basavarajappa DS, Shenoy US, Chakrabarty S , Kabekkodu SP, Hunter KD, et al. In Silico Interaction of HOX Cluster-Embedded MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs in Oral Cancer. Journal of Oral Pathology & Medicine 2021. doi:10.1111/jop.13225

11. Mazzoccoli G, Colangelo T, Panza A, Rubino R, Tiberio C, Palumbo O, et al. Analysis of clock gene-miRNA correlation networks reveals candidate drivers in colorectal cancer. Oncotarget 2016;7:45444. doi:10.18632/oncotarget.9989

12. Mullany LE, Herrick JS, Sakoda LC, Samowitz W, Stevens JR, Wolff RK, et al. miRNA involvement in cell cycle regulation in colorectal cancer cases. Genes & Cancer 2018;9:53. doi:10.18632/genesandcancer.167

13. Tabarestani FO, Akbari A, Karizi SZ, Sotoodehnejadnematalahi F. Regulation of long non-coding RNAs XIST and ROR induced by homeodomain protein TGIF2LX in colorectal cancer. 2021. doi:10.4103/jcrt.JCRT_869_20

14. Jones MF, Hara T, Francis P, Li XL, Bilke S, Zhu Y, et al. The CDX1–microRNA-215 axis regulates colorectal cancer stem cell differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences 2015;112:E1550-E8. doi:10.1073/pnas.1503370112

15. Raoofian R, Noori-Daloii MR, Saee-Rad S, Modarresi MH , Ghaffari SH, Mojarrad M, et al. Differential expression of human homeodomain TGIFLX in brain tumor cell lines. Acta Medica Iranica 2013;834-41.

16. Ashtiani ZO, Ayati M, Modarresi M, Raoofian R, Goulian BS, Greene W, et al. Association of TGIFLX/Y mRNA expression with prostate cancer. Medical Oncology 2009;26:73. doi:10.1007/s12032-008-9086-7

17. Raoofian R, Mojarrad M, Heidari M. Impact of TGIFLX expression on the regulation of BCL2 and BAX in prostate cancer cell line (LNCaP). Journal of Advances in Medicine and Medical Research 2013;953-61. doi:10.9734/BJMMR/2013/2904

18. Youssefian L, Vahidnezhad H, Raoofian R, Greene W, Heidari M. Potential functions of the human homeobox TGIFLX/Y genes in normal and abnormal development. European Journal of Clinical & Medical Oncology 2012;4: doi:10.1002/mrd.20906

19. Emami SS, Akbari A, Zare A-A, Agah S, Masoodi M, Talebi A, et al. MicroRNA expression levels and histopathological features of colorectal cancer. Journal of Gastrointestinal Cancer 2019;50:276-84. doi:10.1007/s12029-018-0055-x

20. Anvarnia A, Mohaddes-Gharamaleki F, Asadi M, Akbari M, Yousefi B ,Shanehbandi D. Dysregulated microRNAs in colorectal carcinogenesis: new insight to cell survival and apoptosis regulation. Journal of Cellular Physiology 2019;234;21683-93. doi:10.1002/jcp.28872

21. Liu T, Liu D, Guan S, Dong M. Diagnostic role of circulating MiR-21 in colorectal cancer: a update meta-analysis. Annals of Medicine. 2021;53:87-102. doi:10.1080/07853890.2020.1828617

22. Xiong B, Cheng Y, Ma L, Zhang C. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. International Journal of Oncology 2013;42:219-28. doi:10.3892/ijo.2012.1707

23. Deng J, Lei W, Fu J-C, Zhang L, Li J-H, Xiong J-P. Targeting miR-21 enhances the sensitivity of human colon cancer HT-29 cells to chemoradiotherapy in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications 2014;443:789-95. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.064

24. Liu L-Z, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1α expression. PloS One 2011;6:e19139. doi:10.1371/journal.pone.0019139

25. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. Oncology 2007;72:397-402 .doi:10.1159/000113489

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2022; Vol 16, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v16i4.2691

Original Article

The Effect of Overexpression of Homeodomain Protein TGIF2LX on the Expression of Oncogenic miRNAs in Colorectal Cancer Cell Line SW1116

Fatemeh Omrani Tabarestani (Ph.D. Student)[1], Abolfazl Akbari (Ph.D.)[2*], Shohreh Zare Karizi (Ph.D.)[3], Fattah Sotoodehnejadnematalahi (Ph.D.)[1]

1- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Colorectal Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Dept. of Genetic, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Iran.

Received: 14 August 2021**, Accepted:** 10 October 2021

Abstract:

Introduction: *Transforming growth factor-beta-induced factor X-linked (TGIF2LX) as a homeodomain protein and TGF-β corepressor, could regulate proliferation of some cancer cells including colorectal cancer by some signaling pathways. Small non-coding RNAs (microRNA; miRNA) are known as molecular regulators of colorectal cancer that are involved in the processes of cell growth, proliferation, differentiation and apoptosis. The aim of this study was to evaluate the biological significance of TGIF2LX protein and its effect on the expression of oncogenic miRNAs miR-34a, miR-20a and miR-21 in colorectal cancer cells SW1116.*

Methods: *Human SW1116 cell line and cell line transfected with cDNA encoding TGIF2LX gene were cultured in RPMI 1640 medium under appropriate conditions. MTT assay was used to assess cell viability in vitro. After RNA extraction from all cell groups and cDNA synthesis, miRNA expression analysis was performed using qReal-time PCR technique.*

Results: *The results showed that the increased expression of TGIF2LX could reduce the proliferation of SW1116 cell line. Gene expression analysis showed that increased expression of TGIF2LX could significantly reduce the expression level of miR-21 ($P<0.038$). However, the expression levels of miR-34a and miR-20a in SW1116 cells transfected with TGIF2LX did not show a significant change compared to non-transfected cells ($P>0.05$).*

Conclusion: *Our findings provide evidence of molecular mechanisms that the homeodomain protein TGIF2LX can act as a tumor suppressor in colorectal cancer cells by reducing miR-21 expression. Therefore, this protein can potentially be considered as a promising option for gene-based therapeutic strategies in this cancer.*

Keywords: Homeodomain protein, TGIF2LX, miRNA, Hox gene, Colorectal cancer, SW1116.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** A. Akbari, **Email**: akbariia2006@gmail.com*

Citation: Omrani Tabarestani F, Akbari A, Zare Karizi Sh, Sotoodehnejadnematalahi F. The effect of overexpression of homeodomain protein TGIF2LX on the expression of oncogenic miRNAs in colorectal cancer cell line SW1116. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2022;16(4):35-42.