مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و نهم، شماره دهم، دی ۱۴۰۰
تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۱/۱۷
تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۵/۰۳

تغییرات بیان ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های سالم در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال

مرضیه قانی دهکردی[۱]، مریم پیمانی[*۱]

مقاله پژوهشی

مقدمه: در مطالعات به متیلاسیون *FOXE1* در سرطان کولورکتال پرداخته شده و از آن به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی نام برده شده است. در این مطالعه برای اولین بار ارتباط بیانی *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال و هم‌چنین مقایسه الگوی بیانی آن‌ها در دو بافت سالم و توموری افراد بیمار مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: در این تحقیق از ۴۰ نمونه بافت بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال و ۴۰ بافت نرمال استفاده شد. سپس استخراج Total RNA و در ادامه سنتز cDNA صورت گرفت. سپس میزان رونوشت اختصاصی ژن‌های *lncRNA PTCSC2* و *FOXE1* در دو بافت توموری و سالم مقایسه شد. نتایج حاصل به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism مورد تحلیل آماری قرار گرفت و جهت بررسی بیان *lncRNA PTCSC2* و *FOXE1* در گروه بیماران و سالم از آزمون T-test و نرم‌افزار پریزم استفاده شد و pکمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج: سطح بیان *FOXE1* به‌طور معنی‌داری در نمونه‌های توموری کاهش نشان داد (P=۰/۰۰۵) درحالیکه سطح بیان *lncRNA PTCSC2* در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال تغییر چشمگیری نداشت (P=۰/۶۵). به علاوه سطح بیان *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* ارتباط معناداری با پیشرفت بیماری و سن بیماران نشان نداد. نمودار ROC نشان داد که ژن *FOXE1* می‌تواند به عنوان یک متغیر مستقل به صورت نسبتاً مناسبی (P=۰/۰۳) میان دو گروه بافت سالم و بیمار مورد مطالعه تغییرات بیانی داشته باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه نتایج این مطالعه، تغییرات بیان ژن *FOXE1* در نمونه‌های توموری کاهش چشمگیری داشت و در سرطان کولورکتال می‌تواند به عنوان یک بیوماکر برای تشخیص تومور مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *LncRNA PTCSC2*، *FOXE1*، سرطان کولورکتال.

ارجاع: قانی دهکردی مرضیه، پیمانی مریم. **تغییرات بیان ژن** FOXE1 **و** lncRNA PTCSC2 **در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های سالم در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۰؛ ۲۹ (۱۰): ۲۹-۴۲۱۹.

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

***(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۰۰۷۶۵۰، پست الکترونیکی:** peymani62_m@yahoo.com**، صندوق پستی :۱۶۶**

مقدمه

سرطان در نتیجه تقسیم غیر قابل کنترل سلول‌ها به‌وجود می‌آید که عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی در بروز آن نقش دارند. سلول‌های سرطانی می‌توانند به بافت‌های مجاور خود حمله کنند و هم‌چنین می‌توانند از طریق خون یا لنف به سایر مناطق بدن متاستاز نمایند و در آن نقطه ایجاد مشکل کنند (۱). متاسفانه شیوع سرطان در سال‌های اخیر به خاطر رشد جمعیت، به‌نحو چشمگیری افزایش یافته است. یکی از قدیمی‌ترین شواهد تایید شده از سرطان در موجودات زنده شامل توده‌های توموری یافت شده در استخوان‌های انسان‌ها از دوران ماقبل تاریخ می‌باشد (۲،۳). در هر بار تقسیم سلول، خطاهایی در طی همانندسازی رخ می‌دهد که منجر به جهش‌هایی جدید در ژنوم سلول‌های دختری می‌شود. علایم اپی‌ژنتیکی (مانند متیلاسیون DNA) با اندازه بزرگتر کروموزوم یا از دست رفتن بخشی از کروموزوم یا افزایش‌ها و هم‌چنین دیگر و بازآرایی‌های ساختاری در بسیاری از سرطان‌ها رخ می‌دهد (۴). دلیل عمده به‌وجود آمدن سرطان در ژن‌های دخیل در کنترل رشد و تقسیم سلول‌ها می‌باشد. یک سلول به‌طور غریزی نمی‌داند که تا چه موقع باید تداوم یابد و یا چه موقع باید متوقف شود. در صورتی‌که رشد و تکثیر سلول دستخوش بی‌نظمی شود، بافت سرطانی به‌وجود می‌آید و به اندام‌ها و بافت‌های مجاور صدمه می‌زند (۵). سرطان کولورکتال سومین سرطان شایع در دنیا بوده و چهارمین عامل مرگ بر اثر سرطان محسوب می‌شود (۶). سرطان کولورکتال یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها با نرخ مرگ و میر بالا است. بر طبق گزارش آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) ۱.۸۰۰.۰۰۰ مورد جدید سرطان کولورکتال و بیش از ۸۶۰.۰۰۰ مرگ ناشی از آن در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است و تقریباً ۱۰ درصد از موارد جدید ابتلا به سرطان را در جهان تشکیل می‌دهد (۷). سرطان کولورکتال دارای دو نوع ارثی و تک‌گیر است که تقریباً ۸۰ درصد موارد آن اسپورادیک و ۲۰ درصد موارد دیگر وراثتی می‌باشند از عوامل ایجادکننده سرطان کولورکتال می‌توان به چاقی، مصرف زیاد نمک، مصرف کم سبزی و میوه، بی‌تحرکی و سیگار کشیدن اشاره نمود (۸). افزایش شیوع سرطان کولورکتال در میان جمعیت ایرانی ۴۰ تا ۶۰ سال پیش‌بینی شده و با وجود عدم انجام بررسی‌های کافی در این خصوص، داده‌ها حاکی از روند رو به گسترش سرطان کولون در جمعیت جوان کشور می‌باشد که احتمالاً ناشی از تغییر عادات غذایی و گرایش ایرانیان و به‌خصوص نسل جوان به فست‌فودها و نیز استعمال دخانیات می‌باشد (۶،۸). به‌طور کلی RNAهای غیر کدکننده بالای ۲۰۰ نوکلئوتید هستند. lncRNAها بر خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلاسیون و فاکتورهای موثر بر رونویسی تاثیرگذار هستند (۹،۱۰). lncRNAها می‌توانند به‌عنوان سیگنال‌های مولکولی به‌کار گرفته شوند چون که رونویسی آن‌ها در زمان و مکان خاصی به‌وقوع می‌پیوندند (۱۱). در سلول‌های یوکاریوتی، بخش بزرگی از RNAهایی که در سلول تولید می‌شوند، RNAهای غیر کدکننده بلند یا lncRNAها هستند (۱۲). lncRNAها با میانکنش با مولکول‌هایی مثل DNA، RNA و پروتئین، نقش ویژه‌ای در انجام فعالیت‌های سلول‌های طبیعی دارند. فعال‌سازی عامل‌های رونویسی، چهارچوب گذاری تجمع پروتئین‌های همکار، تنظیم پردازش متناوب، ترمیم DNA آسیب دیده، تغییر حالت کروماتین، تسهیل فرآیند نقش‌پذیری ژنومی و هم‌چنین موارد دیگر بخشی از فعالیت‌های مهم lncRNAها هستند. با توجه به نقش حیاتی این گونه مولکول‌ها، اختلال در هر یک از عملکردها می‌تواند زمینه‌ساز اصلی فرایند تغییر فرم سلول به سمت بدخیمی و پیدایش سرطان شود. مشابه ژن‌های کد کننده پروتئین، ژن‌های کدکننده lncRNAها هم‌چنین می‌توانند به‌عنوان انکوژن‌های تومورزا و یا ژن‌های سرکوب‌گر تومور عمل کنند. گاهی رونوشت‌های این گونه از ژن‌ها به‌عنوان آنتی سنس عمل کرده و سبب خاموشی جایگاه‌های ژنی سرکوب‌گر تومور می‌شود (۱۰،۱۱). اخیراً مطالعاتی انجام شده است تا درک کنیم چگونه ایجاد lncRNAها از mRNA متمایز است. اغلب lncRNAها توسط RNApol2 رونویسی می‌شوند. هم‌چنین اکثراً کلاهک انتهای '۵ و دم polyA دارند و حدس زده می‌شود مشابه mRNAها رونویسی و پردازش می‌شوند (۱۳،۱۴). به تازگی در مورد اینکه آیا lncRNAهای جهش یافته می‌توانند تومورزایی کنند یا خیر و اینکه آیا چنین عملکردهایی می‌توانند در طول تکامل حفظ شوند، بحث

می‌شود (۱۵). *FOXE1* به عنوان فاکتور رونویسی تیروئید ۲ شناخته می‌شود، یک ژن کدکننده اکسون تک متعلق به خانواده پروتئین دامنه هلیکس است. *FOXE1* برای توسعه غده تیروئید و نگهداری وضعیت تمایز تیروئید ضروری است. هم‌چنین در تشخیص و توسعه سرطان تیروئید نقش دارد. *PTCSC2* دارای یک ایزوفرم پیرایش نشده و چندین ایزوفرم پیرایش شده است که همگی بیان ویژه تیروئید را نشان می‌دهند. تومورهای PTC، به‌طور قابل ملاحظه‌ای با بیان کم *PTCSC2* و *FOXE1* ارتباط دارد (۱۶). سرطان پاپیلاری تیروئید (PTC)، شایع‌ترین سرطان غدد درون‌ریز است و *lncRNA PTCSC2* یکی از کاندیدای ایجاد سرطان پاپیلاری تیروئید است. اما نحوه عملکرد آن در فرایند سرطان‌زایی مشخص نشده است. در طی بررسی‌های به عمل آمده نشان داده شده است که میوزین ۹ *(MYH9)*، به عنوان پروتئین متصل شونده به *PTCSC2* شناسایی شده است که باعث تنظیم پروموتر در *PTCSC2* و ژن *FOXE1* می‌شود (۱۷). هم‌چنین لازم به ذکر است که دو ژن*FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* بر روی یک کروموزوم و نزدیک یکدیگر قرار گرفته‌اند و جهت رونویسی آن‌ها خلاف یکدیگر است (۱۸). در مطالعات مختلف، به متیلاسیون *FOXE1* در سرطان کولورکتال پرداخته شده و از آن به عنوان یک بیومارکر تشخیصی نام برده شده است (۱۶). یک جایگاه یا لوکوس روی ناحیه کروموزومی 9q22، محل یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی یا SNP مربوط به rs965513 است که به بیماری سرطان پاپیلاری تیروئید وابسته است. در سرطان تیروئید همراهی بیان این ژن با *lncRNA PTCSC2* نشان داده شده است (۱۷). به دلیل شیوع بالای سرطان کولورکتال در ایران و جهان (۷،۱۹) و نیز به علت اینکه در مطالعات پیشین به بررسی ارتباط *FOXE1* در سرطان کولورکتال پرداخته شده است (۱۹) و اینکه تا پیش از این به بررسی ارتباط بیانی ژن *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال پرداخته نشده بود برآن شدیم تا در این پژوهش به بررسی بیان ژن‌های *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال بپردازیم. این مطالعه برای اولین بار ارتباط بیانی *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال و هم‌چنین مقایسه الگوی بیانی آن‌ها در دو بافت سالم و توموری افراد بیمار مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

نوع مطالعه، جمع آوری نمونه، استخراج RNA و سنتز cDNA

پژوهش حاضر از نوع مورد- شاهدی بوده و یک مطالعه تجربی می‌باشد. در این پژوهش از ۴۰ نمونه بافت بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال با تاییدیه پزشک متخصص پاتوبیولوژیست طبق معاینه و معیار گزارش شده و هم‌چنین با رضایت کتبی از بیماران، نمونه‌گیری انجام شد. لازم به ذکر است که از ۴۰ بافت سالم از بخش سالم روده افراد بیمار نیز نمونه‌گیری بافت انجام شد. انتخاب تعداد نمونه‌ها بر اساس منابع معتبر علمی و مقالات مشابه انجام شد. نمونه‌های بافت توموری و سالم بلافاصله پس از جراحی درون محلول RNA Latter (بهنوژن ساخت کشور ایران) قرار داده شد و به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند و بلافاصله نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه و در نهایت در دمای ۲۰- درجه فریز شدند. سپس به منظور استخراج RNA تام از ترایزول ساخت کشور امریکا (Invitrogen) مطابق پروتکل استفاده شد و در نهایت RNA استخراج شده از لحاظ کیفی و کمی بررسی شد. در این بررسی به منظور حذف آلودگی احتمالی RNA استخراج شده به DNA ژنومی، هر نمونه RNA استخراج شده با آنزیم *DNase*I (سیناژن) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد و سپس به منظور خنثی‌سازی آنزیم *DNase*I هر نمونه با ۱ میکرولیتر اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) تیمار شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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. در این تحقیق به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن، توسط نرم‌افزار Beacon Designer 8.0 (۲۰) طراحی شد و پس از BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، توسط شرکت پیشگام سنتز شد که در جدول ۱ توالی

آغازگرهای مورد استفاده در روش RT-qPCR آورده شده است. پس از تائید صحت سنتز cDNA، از تکنیک 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 ساخت کشور ایران) استفاده گردید و پس از محاسبه ΔCT نسبت بیان ژن هدف در نمونه مورد نظر (بیمار) نسبت به نمونه کنترل (سالم) با فرمول $2^{-\Delta CT}$ محاسبه شد (۲۱).

جدول۱: توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک RT-PCR

پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال (°C)	سایز باند (bp)
FOXE1 - F	5'-GTAACCAGAGGGCAGCGTAG-3'	۶۳	
FOXE1 - R	5'-GCGTAAAAAGGCCCGAGTTC-3'	۶۰	۱۰۴
PTCSC2 - F	5'-CCAGTCTGCAAATTCCCAAGC-3'	۶۱	
PTCSC2 - R	5'-AGGCATCCCACTCTTCCTTG-3'	۶۰	۱۹۲
GAPDH- F	5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3'		
GAPDH -R	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	۶۴	۴۹۶

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش پس از به دست آوردن میزان فراوانی نسبی بیان برای ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال به‌منظور مقایسه نتایج با یک دیگر از آزمون‌های مختلف استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزارهای GraphPad Prism و Excel استفاده شد و پس از تایید نرمال بودن حجم نمونه با آزمون Shapiro جهت بررسی اختلاف بیان ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و سالم از آزمون T-test استفاده شد. برای مقایسه بیان ژن‌ها در stageهای مختلف از آزمونone way ANOVA استفاده شد. هم‌چنین برای بررسی همبستگی بیان زن‌های مورد نظر در این پژوهش از آزمون pearson استفاده شد. لازم به ذکر است که برای تمام محاسبات آماری انجام شده P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با کد IR.IAU.SHKREC.1398.019 به تصویب رسیده است.

نتایج

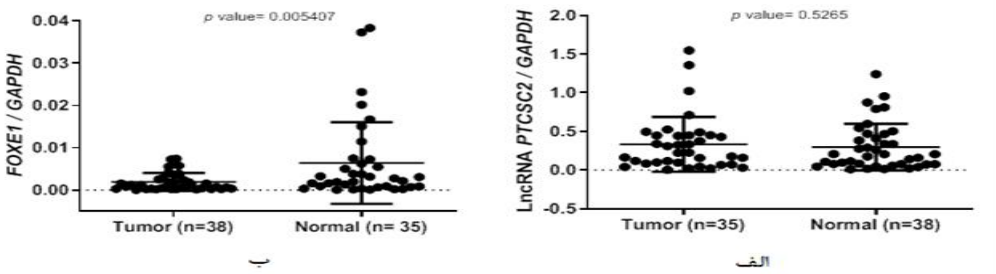
بررسی و مقایسه بیان *FOXE1* و *LncRNA PTCSC2* در بافت‌های توموری و سالم

در این مطالعه، سطح بیان *FOXE1* به‌طور معنی‌داری در نمونه‌های توموری کاهش نشان داد (P=۰/۰۰۵) در حالیکه سطح بیان *lncRNA PTCSC2* در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال تغییر چشمگیری نداشت (P=۰/۵۵). به منظور آنالیز آماری نتایج و بررسی تغییرات سطح بیان این ژن‌ها در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های سالم، از نرم‌افزار Prism v.8 استفاده گردید و از آزمون Independent-Sample t-test، جهت بررسی میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده شد. در شکل (۱ الف و ب) نمودار تغییر سطح بیان نسبی ژن‌ها در سطح $۲^{-\Delta Ct}$ در دو گروه بافت توموری و بافت سالم به همراه میزان معنی‌داری بین هر دو گروه با یکدیگر، نشان داده شده است. سپس به منظور بررسی همبستگی بیان ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro Wilk استفاده شد و با مشاهده $P > 0.05$، مشخص گردید که توزیع داده‌ها به صورت نرمال می‌باشد. لذا از آزمون Pearson همبستگی این دو ژن ارزیابی شد. نتایج نشان داد که این دو ژن در بافت توموری، همبستگی مثبت دارند (R=

0.09482) اما این همبستگی بیانی، معنی‌دار نمی‌باشد (P>0.05).

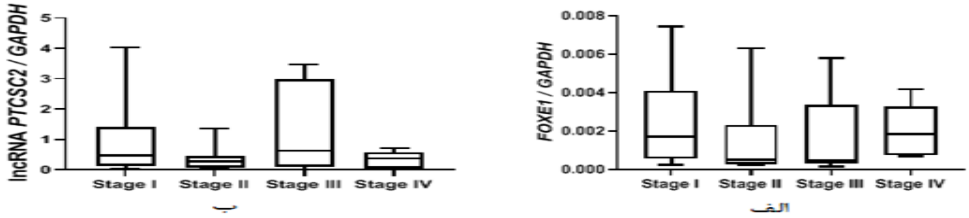
بررسی و مقایسه بیان *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در مراحل مختلف بافت‌های توموری

در این مطالعه، سطح بیان *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در مراحل مختلف بیماری در بافت‌های توموری با استفاده از تکنیک RT- qPCR و با استفاده از روش ΔCt مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیان این ژن‌ها در مراحل مختلف بیماری تغییر معنی‌داری ندارد. به منظور آنالیز آماری نتایج و بررسی تغییرات سطح بیان این ژن‌ها در مراحل مختلف در بافت‌های توموری، از نرم‌افزار Prism *v*.8 استفاده گردید و از آزمون One-way ANOVA، جهت بررسی میزان معنی داری داده‌ها استفاده شد. در شکل (۲ الف و ب)، نمودار تغییر سطح بیان نسبی ژن‌ها در سطح $۲^{-\Delta Ct}$ در مراحل مختلف در مقایسه با یکدیگر، نشان داده شده است.



شکل ۱: الف) نمودار تغییر سطح بیان نسبی *lncRNA PTCSC2* در بافت‌های توموری نسبت به سالم که دارای تغییرات معنی‌دار نبود (P=۰/۵۲)

ب) نمودار تغییر سطح بیان نسبی *FOXE1* در بافت‌های توموری نسبت به سالم دارای کاهش چشمگیری بود (P=۰/۰۰۵).

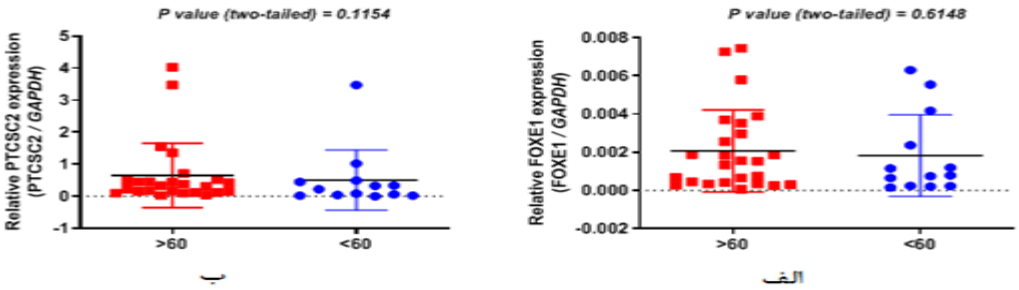


شکل ۲(الف و ب): مقایسه بیان *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در مراحل مختلف بیماری در بافت‌های توموری. نتایج نشان داد سطح بیان این ژن‌ها در stageهای مختلف بیماری تغییر معنی‌داری ندارند.

بررسی و مقایسه بیان *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در بافت‌های توموری بر اساس سن افراد بیمار

در این مطالعه، سطح بیان *FOXE1* و*lncRNA PTCSC2* در دو گروه سنی بالای ۶۰ سال و پایین‌تر از ۶۰ سال در بافت‌های توموری با استفاده از تکنیک RT- qPCR و با استفاده از روش ΔCt مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیان این ژن‌ها در دو گروه مورد بررسی تغییر معنی‌داری ندارد. به منظور آنالیز آماری نتایج و بررسی تغییرات سطح بیان این ژن‌ها در دو گروه موردنظر در بافت‌های توموری، از نرم‌افزار Prism v.8 استفاده گردید و از آزمون Independent-Sample t-test، جهت بررسی میزان معنی داری داده‌ها استفاده شد. بررسی ارتباط بیان ژن *FOXE1* با سن بیماران نشان داد که تغییرات بیان این ژن ارتباط معناداری با سن بیماران در سرطان کولورکتال ندارد (P=۰/۶۱) که در شکل (۳ الف و ب) نشان داده شده است. بنابراین سن بیماران مبتلا به سرطان عامل اثرگذاری در تغییرات بیان ژنی برای ژن *FOXE1* نیست. هم‌چنین بررسی ارتباط *lncRNA PTCSC2* با سن بیماران نشان داد که این ژن ارتباط

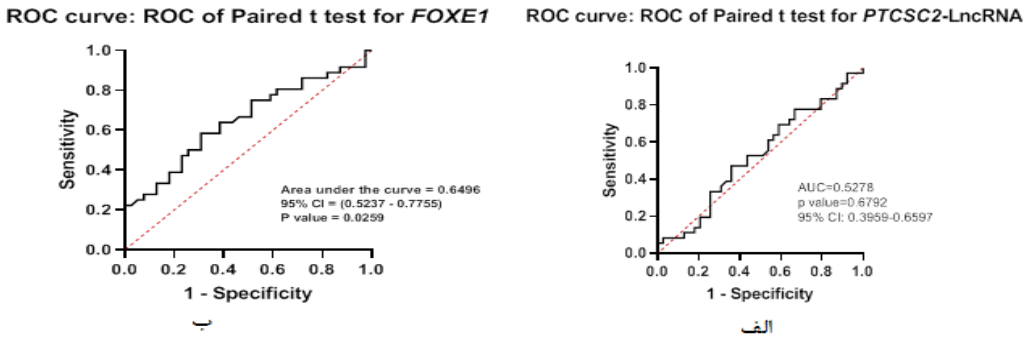
معناداری با سن بیماران در سرطان کولورکتال نداشته و همانند ژن *FOXE1* پارامتر سن بیماران مبتلا به سرطان عامل موثری بر تغییرات بیان *lncRNA PTCSC2* نیست (P=۰/۱۴). در شکل (۸)، نمودار تغییر سطح بیان نسبی ژن‌ها در سطح $2^{-\Delta Ct}$ دردو گروه سنی در بافت‌های توموری، نشان داده شده است.



شکل ۳ (الف و ب): مقایسه بیان *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در بافت‌های توموری بر اساس سن افراد بیمار. نتایج نشان داد سطح بیان این ژن‌ها در دو گروه مورد بررسی تغییر معنی‌داری ندارد (P=۰/۶۱۴۸) و (P=۰/۱۱۵۴).

بررسی اختصاصیت و حساسیت *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال

به‌منظور بررسی اختصاصیت و حساسیت هر یک از ژن‌های موردنظر 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. به‌طور 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 Youden به‌عنوان پارامترهای ارزیابی برای بررسی حساسیت و اختصاصیت فاکتورهای مورد بررسی در مطالعات زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که هر چه سطح زیر نمودار و یا حد اکثر مقدار فاکتور Youden بیشتر باشد کارایی فاکتور افزایش می‌یابد. بر همین اساس نمودار ROC برای تغییرات بیان ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* و نتایج حاصل نشان داد که ژن *FOXE1* می‌تواند به‌عنوان یک متغیر مستقل به صورت نسبتاً مناسبی (P=۰/۰۹) 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=۰/۶۵) که در شکل (۴) نشان داده شده است. هم‌چنین بررسی فاکتور Youden برای این نمودار نشان داد که حداکثر مقدار این فاکتور برابر با ۰/۲۸ و معادل با حساسیت ۶۹/۲۳ درصد و اختصاصیت ۵۸/۳۳ درصد می‌باشد که نشان می‌دهد ژن *FOXE1* می‌تواند به عنوان یک شاخص نسبتاً مناسب جهت تمایز بافت‌های سرطانی از سالم مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر بررسی منحنی ROC برای *lncRNA PTCSC2* نشان داد که *lncRNA PTCSC2* توانایی به‌کارگیری به‌عنوان یک عامل ارزیابی برای بررسی تمایز بافت‌های توموری و سالم را ندارد (P=۰/۶۸) که در شکل (۴ الف و ب) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که *FOXE1* به‌عنوان یک مارکر به‌طور معنی‌داری می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و می‌تواند به بهبود تشخیص بیماری سرطان کولورکتال کمک کند.



شکل ۴- الف) اختصاصیت و حساسیت *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال با رسم نمودار ROC. ب) اختصاصیت و حساسیت *FOXE1* در سرطان کولورکتال با رسم نمودار ROC. الف) اختصاصیت و حساسیت *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال با رسم نمودار ROC که نمی‌تواند به عنوان یک عامل پیشگویی کننده جهت ارزیابی احتمال بروز سرطان کولورکتال نقش ایفا کند (P=۰/۶۸). ب) اختصاصیت و حساسیت *FOXE1* در سرطان کولورکتال با رسم نمودار ROC که می‌تواند به عنوان یک عامل پیشگویی کننده جهت ارزیابی احتمال بروز سرطان کولورکتال نقش ایفا کند (P=۰/۰۳).

بحث

تا امروز در سرطان کولورکتال شاهد مرگ و میر زیادی بوده‌ایم اما هنوز فاکتورهای کلیدی در جنبه‌های مختلف این بیماری ناشناخته مانده است و بررسی‌ها نشان داده است که RNA غیرکدکننده بلند *PTCSC2* یکی از کاندیدای ایجاد سرطان پاپیلاری تیروئید است اما نحوه عملکرد آن در فرآیند سرطان‌زایی مشخص نشده است. در طی بررسی‌های به عمل آمده نشان داده شده است که میوزین ۹ *(MYH9)* به عنوان پروتئین متصل شونده به *PTCSC2* شناسایی شده است که باعث تنظیم پروموتر در *PTCSC2* و ژن *FOXE1* می‌شود (۱۷). در این مطالعه برای اولین بار ارتباط بیانی *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در سرطان کولورکتال و هم‌چنین مقایسه الگوی بیانی آن‌ها در دو بافت سالم و توموری افراد بیمار مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که ژن *FOXE1* در بافت توموری نسبت به بافت سالم کاهش می‌یابد. در ادامه به بررسی نتایج با استفاده از تحقیقات انجام شده پرداخته شده است. He و همکاران در سال ۲۰۱۵ در طی آزمایشات ویژه خود یک ژن long non-coding RNA (lncRNA) با طول عمر طولانی کشف کردند و آن را *PTCSC2* نامیدند. مشاهده شد که *PTCSC2* در سرطان تیروئید به میزان کمی بیان شده است هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد که بین میزان بیان *FOXE1* و ابتلا به سرطان تیروئید نسبت عکس وجود دارد (۱۷). در پژوهش حاضر بررسی بیان ژن *FOXE1* در بافت‌های توموری و سالم نشان داد که در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ میزان بیان این ژن به‌صورت معناداری در بافت توموری نسبت به بافت سالم کاهش پیدا می‌کند. اما بیان *lncRNA PTCSC2* در بافت‌های توموری و سالم با استفاده از آزمون آماری T مستقل نشان داد که در سطح معنی کمتر از ۰/۰۵ میزان تغییرات بیان *lncRNA PTCSC2* در بافت‌های سالم و توموری معنادار نبوده است. Melotte و همکاران در سال ۲۰۱۵، به بررسی ارتباط *FOXE1* با سرطان کولورکتال پرداخته و مشاهده نمودند که متیلاسیون سبب تغییر نوکلئوتیدها و DNA شده و درنتیجه برخی از این فاکتورهای تنظیمی نمی‌توانند به‌DNA متصل شوند. در نتیجه کاهش متیلاسیون بیان *FOXE1* نیز کم خواهد شد. این محققان در نهایت گزارش کردند که با ردیابی *FOXE1* در خون، می‌توان به پیش‌بینی ابتلای به سرطان کولورکتال مبادرت کرد (۲۲). با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه بر اهمیت نقش تغییرات بیان ژن *lncRNA PTCSC2* و *FOXE1* در سرطان کولورکتال می‌توان نتیجه گرفت که ژن *FOXE1* می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی برای سرطان کولورکتال و هم‌چنین به بهبود تشخیص بیماری سرطان کولورکتال کمک کند. گروهی

از محققان به سرپرستی Sugimachi در سال ۲۰۱۶ با متیلاسیون *FOXE1* به بررسی اثرات آن بر سرطان پرداختند. آن‌ها نتیجه گرفتند که بیان *FOXE1* به‌صورت معناداری در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال کمتر است اما با سن بیماری ارتباط ندارد (۲۳). که این نتایج با نتایج ما همسو بود و نتایج ما نشان داد که بیان ژن *FOXE1* در بافت‌های توموری و سالم به‌صورت معناداری در بافت توموری نسبت به بافت سالم کاهش پیدا می‌کند. بنابراین می‌توان اظهار داشت که تغییرات بیان ژن *FOXE1* می‌تواند به عنوان شاخصی مناسب برای تمایز نمونه‌های سرطانی در سرطان کولورکتال مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر بررسی ارتباط بیان ژن *FOXE1* با سن بیماران نشان داد که تغییرات بیان این ژن ارتباط معناداری با سن بیماران در سرطان کولورکتال ندارد. بنابراین سن بیماران مبتلا به سرطان عامل اثرگذاری در تغییرات بیان ژنی برای ژن *FOXE1* نیست. هم‌چنین بررسی ارتباط lncRNA *PTCSC2* با سن بیماران نشان داد که این ژن ارتباط معناداری با سن بیماران در سرطان کولورکتال نداشته و همانند ژن *FOXE1* پارامتر سن بیماران مبتلا به سرطان عامل موثری بر تغییرات بیان این lncRNA نیست. در سال ۲۰۱۸ فواد و همکاران به بررسی بیان *FOXE1* و *STIP-1* در کارسینومای پاپیلار تیروئید و ارتباط آن‌ها با پیش آگهی بیماران پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند که سطوح بالا بیان *FOXE1* و *STIP-1* در PTC با اندازه بزرگتر تومور، گسترش اضافی تیروئید، حمله قلبی، وجود متاستازهای دوردست، سن و مراحل بالاتر سرطان در ارتباط است (۲۴). هم‌چنین در پژوهش حاضر بررسی ارتباط تغییرات بیان ژن *FOXE1* و lncRNA *PTCSC2* با stage بیماری نشان داد که میزان بیان ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* در Stage سرطان کولورکتال ارتباط معناداری ندارد. به علاوه بررسی ارتباط بیان ژن *FOXE1* و *lncRNA PTCSC2* با سن بیماران نشان داد که تغییرات بیان این ژن ارتباط معناداری با سن بیماران در سرطان کولورکتال ندارد. در نهایت در سال ۲۰۱۹ ما و همکاران به بررسی ژن *FOXE1* در کارسینوم پاپیلاری تیروئید پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند که *Gli2* باعث افزایش رشد تومورهای PTC و تکثیر، مهاجرت و تهاجم می‌شود که این مسیر از طریق بیان ژن *FOXE1* انجام می‌شود (۲۵). از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به کوچک بودن جامعه مورد مطالعه اشاره کرد که به دلیلی سخت بودن فرآیند جمع‌آوری نمونه بافت بیماران با این محدودیت مواجه بودیم. نتایج پژوهش حاضر حاکی از ان بود که *FOXE1* در سرطان کولورکتال به طور معناداری کاهش پیدا می‌کند و ژن *FOXE1* می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی برای سرطان کولورکتال و هم‌چنین به بهبود تشخیص بیماری سرطان کولورکتال کمک کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، تغییرات بیان ژن *FOXE1* در سرطان کولورکتال می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر در کنار سایر فاکتورهای تشخیصی برای سرطان کولورکتال و هم‌چنین به بهبود تشخیص بیماری سرطان کولورکتال کمک کند. با توجه به اینکه در مطالعاتی که پیش‌تر انجام شده است، این یافته گزارش شده است، لذا نتیجه‌ی این پژوهش مؤید نتایج بررسی‌های پیشین است. لازم به ذکر است، بین بیان ژن *lncRNA PTCSC2* و بیان ژن *FOXE1* در ایجاد سرطان کولورکتال، رابطه‌ای یافت نشد.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد. بدین وسیله از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های بافت در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

حامی مالی: این مقاله تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌باشد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

References:

1-C.Athena Aktipis, Randolph M, Nesse. ***Evolutionary Foundations for Cancer Biology***. Evol 2013; 6(1): 144-159.

2-Rothschild BM, Tanke DH, Helbling M. ***Epidemiologic Study of Tumors in Dinosaurs***. Naturwissenschaften 2003; 90: 495-500.

3-Mino-Kenudson M. ***Immunohistochemistry for Predictive Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer***. Transl Lung Cancer Res 2017; 6(5): 570-87.

4-Graham TA, Sottoriva A. ***Measuring Cancer Evolution from the Genome***. J Pathology 2017; 241: 183-91.

5-Chen F, Zhang Y, Varambally S, Creighton CJ. ***Molecular Correlates of Metastasis by Systematic Pan-Cancer Analysis across the Cancer Genome Atlas***. Mol Cancer Res 2018; 17(2): 476-87.

6-Akhoond MR, Kazemnejad A, Hajizadeh A, Ganbary Motlagh A, Zali MR. ***Comparison of Influential Factors Affecting Survival of Patients with Colon and Rectum Cancer Using Competing Risks Model***. Koomesh 2011; 12(2): 119-28. [Persian]

7-WU Y, Jiao Na, Zhu Ruixin, Zhang Y, Wu D, An-Jun W, et al. ***Identification of Microbial Markers Across Populations in Early Detection of Colorectal Cancer***. Nat Commun 2021; 12(1): 3063.

8-Montazer haghighi M, Mohebi SR, Najjar Sadeghi R, Vahedi Ghiasi S, Zali MR. ***G1793A Genotype of MTHFR Gene in Patients with Sporadic Colorectal Cancer in Iran***. Asian Pac J Cancer Prev 2008; 9(4): 659-62.

9-Furuno M, Pang KC, Ninomiya N, Fukuda S, Frith MC, et al. ***Clusters of Internally Primed Transcripts Reveal Novel Long Noncoding Rnas***. Plos Genet 2006; 2(4): e37.

10-Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF. ***Chromatin Signature Reveals Over a Thousand Highly Conserved Large Non-Coding Rnas in Mammals***. Nature 2009; 458(7235): 223-7.

11-Ding X, Zhu L, Ji T, Zhang X, Wang F, et al. ***Long Intergenic Non-Coding Rnas (Lincrnas) Identified by RNA-Seq in Breast Cancer***. Plos One 2014; 9(8): e103270.

12-Zhu S, Li W, Liu J, Chen CH, Liao Q, et al. ***Genome-Scale Deletion Screening of Human Long Non-Coding Rnas Using a Paired-Guide RNA CRISPR-Cas9 Library***. Nat Biotechnol 2016; 34(12): 1279-86.

13-Noori-Daloii MR, Eshaghkhani Y. ***Lncrnas: Significance and Function Mechanisms***. J Medical Science of Azad Islamic University 2015; 25(2): 79-94. [Persian]

14-Luisa S, Chun-Jie G, Ling-Ling C, Maite H, Jakob Skou P, et al. ***Gene Regulation by Long Non-Coding Rnas and its Biological Functions.*** J Nature Reviews Molecular Cell Biology Reviews 2021; 22; 96-118.

15-Joana Carlevaro-Fita, Andrés L, Lars F, Chen H, David Mas-Ponte, et al. ***Cancer Lncrna Census Reveals Evidence for Deep Functional Conservation of Long Noncoding Rnas in Tumorigenesis***. Communications Biology 2020; 3: 56.

16-Wang Y, He H, Li W, Phay J, Shen R, et al. ***MYH9 Binds to Lncrna Gene PTCSC2 and Regulates FOXE1 in the 9q22 Thyroid Cancer Risk Locus***. Proc Natl Acad Sci USA 2017; 114(3): 474-79.

17-He H, Li W, Liyanarachchi S, Jendrzejewski J, De La Chapelle A***. Genetic Predisposition to Papillary Thyroid Carcinoma: Involvement of FOXE1, TSHR, and a Novel Lincrna Gene, PTCSC2***. J Clin Endocrinol & Metab 2015; 100(1): E164-E72.

18-Situation in FOXE1 forkhead box E1. 2021. Available at: https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ gene/2304. Accessed November 28, 2021.

19-Rahimi Pordanjani S, Baeradeh N, Lotfi MH, Pourmohammadi B***. Epidemiology of Colorectal Cancer: Incidence, Mortality, Survival Rates and Risk Factors***. Razi J Med Sci (RJMS) 2016; 23(144): 41-50. [Persian]

20-Singh G, Vajpayee P, Rani N, Amoah ID, Stenström TA, Shanker R. ***Exploring the Potential Reservoirs of No Specific. TEM Beta Lactamase (Blatem) Gene in the Indo-Gangetic Region: A Risk Assessment Approach to Predict Health Hazards***. J Hazardous Materials 2016; 314: 121-8.

21-Chen C, Tan R, Wong L, Fekete R, Halsey J. ***Quantitation of Microrna by Real-Time RT-Qpcr.*** PCR Protocols 2011; 34(9): 113-34.

22-Melotte V, Yi JM, Lentjes MH, Smits KM, Van Neste L, et al. ***Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope 1 and Forkhead Box Protein E1 are Promising Markers for the Detection of Colorectal Cancer in Blood***. Cancer Prev Res (Phila) 2015; 8(2): 157-64.

23-Sugimachi K, Matsumura T, Shimamura T, Hirata H, Uchi R, et al. ***Aberrant Methylation of FOXE1 Contributes to A Poor Prognosis for Patients with Colorectal Cancer***. Ann Surg Oncol 2016; 23(12): 3948-55.

24-Fouad EM, Harb OA, Amin SR. ***The Expression of FOXE-1 and STIP-1 in Papillary Thyroid Carcinoma and their Relationship with Patient Prognosis***. Iran J Pathol 2018; 13(2): 256-71.

25-Ma J, Huang X, Li Z, Shen Y, Lai J, Su Q, Xu J. ***FOXE1 Supports the Tumor Promotion of Gli2 on Papillary Thyroid Carcinoma by the Wnt/B-Catenin Pathway***. J Cell Physiol 2019; 2(9): 34-40.

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences **Received: 6 Apr 2021**
Vol 29| NO 10 | Jan 2022 **Accepted: 25 Jul 2021**

Expression Changes of the *FOXE1* and lncRNA PTCSC2 Expression in Tumor Tissues Compared with Normal Tissues in Patients with Colorectal Cancer

Marzieh Ghani Dehkordi[1], Maryam Peymani[*1]

Original Article

Introduction: In recent studies, methylation of *FOXE1* in colorectal cancer has been reported as a diagnostic biomarker. In this study for the first time, the expression of *FOXE1* and *PTCSC2* in colorectal cancer was investigated and their expression patterns in two healthy and tumor tissues of patients were compared.

Methods: In this study, 40 tumor tissues with colorectal cancer and 40 adjacent normal samples were collected. Total RNA was extracted and cDNA synthesis followed. Then, the specific genes for *lncRNA PTCSC2* and *FOXE1* were amplified. The results were statistically analyzed by Graph Pad Prism software and a T-test was used to compare the expression levels of *lncRNA PTCSC2* and *FOXE1* in the patients and healthy group; p-value less than 0.05 was considered significant difference criteria.

Results: In this study, *the FOXE1* expression level was significantly decreased in tumor tissue (p-value = 0.005), whereas the *lncRNA PTCSC2* expression level in tumor tissue was not significantly changed (p-value = 0.65). In addition, the expression levels of *FOXE1* and *lncRNA PTCSC2* did not show a significant relation with disease progression and age of the patients. ROC curve for changes in *FOXE1* and *lncRNA PTCSC2* expression showed that the*FOXE1* gene could be a relatively appropriate independent variable (p-value = 0.03) to differentiate between the two study groups.

Conclusion: According to the results of this study, changes in FOXE1 gene expression were significantly reduced in tumor samples and can be used as a biomarker in tumor diagnosis in colorectal cancer.

Keywords: lncRNA PTCSC2 expression, FOXE1 expression, Colorectal Cancer.

Citation: Ghani Dehkordi M, Peymani M. **Expression changes of the FOXE1 and lncRNA PTCSC2 Expression in Tumor Tissues Compared with Normal Tissues in Patients with Colorectal Cancer.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 29(10): 4219-29.

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 09132007650**, email:** peymani62_m@yahoo.com