*Research on Medicine* *Original Article*

*The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences* Vol.43; No.1; 2019

# Study of the role of HOTAIR gene on colorectal cancer using Real-time PCR

**Seyed Rafi Bahavarnia[1], Habib Onsori [2],Behzad Baradaran[*3]**

*1. Department of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University tabriz, Iran*
*2. Department of Genetics, Marand Branch, Islamic Azad University Marand, Iran*
*3. Tabriz Immunology Research Center, Tabriz, Iran*

(Received: 2018/07/08 Accept: 2018/11/17)

## Abstract

***Background:*** *Despite advances in cancer studies, colorectal cancer, as the third most common cancer, has the highest mortality rate worldwide. Due to its high prevalence in the younger ages and advanced stages, screening of this cancer with molecular methods is necessary. Studies have shown that HOTAIR gene plays an important role in cancers. Our aim in the present study was to determine the expression of HOTAIR gene in tumor and tumor margins of patients with colorectal cancer using Real-Time PCR.*

***Materials and method:*** *In the present case-control study, 47 colorectal cancer patients who had referred to Imam Reza Hospital in Tabriz from May to March 2011 were evaluated. Samples were subjected to extraction of RNA after confirmation by the pathologist, and then the HOTAIR gene expression was measured and analyzed using Real Time-PCR and Graph Pad Prism, respectively.*

***Findings:*** *The expression level of HOTAIR in tumor samples was about seven times higher than that of marginal samples ($p = 0.0009$). Also, by increasing the degree of tumor differentiation, the expression of HOTAIR gene decreased ($p = 0.023$).*

***Conclusion:*** *HOTAIR gene is involved in the pathogenesis of colorectal cancer, and the use of expression analysis of this gene as a biomarker can be helpful in diagnosis, treatment, and prognosis of patients, although more studies are needed to verify this claim.*

**Keywords:** *HOTAIR; Real time PCR; Colorectal cancer; lncRNA*

** Corosponding author: : Behzad Baradaran*
*E-mail:behzad_im@yahoo.com*

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-14 ]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۳، شماره ٤، ۱۳۹۸، صفحات ۳٤ تا ۳۹

# بررسی نقش ژن HOTAIR با بروز سرطان کولورکتال به روش Real-time PCR

**سید رفیع بهاورنیا[۱]، حبیب عنصری[۲]، بهزاد برادران*[۳]**

۱- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲- گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران
۳- مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۶/۲۸

## چکیده:

**سابقه وهدف:** با وجود پیشرفتهاي زیاد در زمینه سرطان، هنوزسرطان کولورکتال (*CRC*) به عنوان سومین سرطان شایع بالاترین میزان مرگ و میر را دارد. با توجه به شیوع بالاي آن در سنین پایین و مراحل پیشرفتهتر غربالگري و درمان این سرطان با روشهاي مولکولي ضروري است. مطالعهها نشان دادهاند که ژن *HOTAIR* در سرطانهاي مختلف نقش مهمي دارد. هدف ما در این مطالعه بررسي بیان ژن *HOTAIR* در نمونههاي توموري و حاشیه توموري بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به روش *Real-Time PCR* است.

**مواد و روش بررسی:** در این مطالعه مورد - شاهدي ۴۷ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا (ع) شهر تبریز از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۹۵ بررسي شدند. بعد از تایید پاتولوژیکی نمونهها واستخراج*RNA* ، بیان ژن *HOTAIR* به روش *Real time-PCR* اندازهگیری و با نرمافزار *Graph pad Prism* آنالیزشد.

**یافتهها:** سطح بیان ژن *HOTAIR*در نمونههای مارژینال حدود ۷ برابر بیشتر بود($p=۰/۰۰۰۹$). همچنین با افزایش درجه تمایز تومور میزان بیان ژن *HOTAIR* کاهش می‌یابد($p=۰/۰۲۳$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج ما نشان می‌دهد که ژن *HOTAIR* در پاتوژنز سرطان کولورکتال دخالت دارد و استفاده از آنالیز بیانی این ژن به عنوان بیومارکر می‌تواند درتشخیص، درمان و پیش آگهی این بیماران مفید باشد، هرچند برای تایید این ادعا به مطالعهها و بررسی‌های بیشتری نیاز است.

**واژگان کلیدی:** *Real time PCR*، *HOTAIR*، سرطان کولورکتال، *Non coding RNA*

## مقدمه:

سرطان کولورکتال به‌عنوان سرطان اصلی در دنیا شناخته شده است که ۹,۷درصد همه سرطان‌ها را شامل می‌شود و سومین سرطان شایع در هر دو جنس است به‌طوری‌که از هر ۲۲ مرد یا ۲۴ زن یک نفر در طول زندگی خود به سرطان کولورکتال مبتلا می‌شود. ۱۰درصد مرگ‌های ناشی از سرطان در کشورهای غربی به‌علت سرطان کولورکتال است که در سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۳ حدود ۷۵درصد افزایش یافته است(۱, ۲). ناحیه خاورمیانه گرچه به‌عنوان منطقه کم خطر برای سرطان کولورکتال محسوب می‌شود، ولی در مقایسه با کشورهای غربی بیماران در سنین پایین‌تری مبتلا می‌شوند. در ایران گرچه فراوانی سرطان کولورکتال پایین است ولی یک افزایش واضح و خفیف در میزان آن مشاهده می‌شود به‌طوری که ۶,۳درصد مرگ‌های ناش از سرطان در ایران را به خود اختصاص داده است(۳-۵). با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه تشخیص و درمان سرطان کولورکتال هنوز امید به زندگی در این بیماران تغییری نکرده است به همین دلیل و با توجه به اینکه سرطان کولورکتال از یک ادنوم اولیه منشأ می‌گیرد برنامه‌های غربالگری مورد توجه زیادی قرار گرفته است. به‌خصوص روش‌های غیر تهاجمی که به‌عنوان استاندارد طلایی غربالگری سرطان کولورکتال مطرح شده است(۲).

سرطان کولورکتال یک بیماری هتروژن است و تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول‌های اپی تلیال کولون باعث ایجاد سرطان می‌شود(۶). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که نسبت زیادی از این تغییرات اپی ژنتیکی در نواحی غیر کد کننده ژنوم که شامل مناطق RNAهای غیر کد کننده (Non coding RNA) مانند میکرو RNA ها و LncRNA (Long non coding RNA) است، قرار دارند(۷). شناسایی و دسترسی آسان به LncRNA ها در مایعات بدن از جمله خون و ادرار باعث استفاده گسترده از آن‌ها به‌عنوان بیومارکرهای جدید برای تشخیص- پیش آگهی و جواب به درمان سرطان کولورکتال شده است. این RNA ها پروفایل بیانی منحصربفردی در سرطان‌های مختلف نشان می دهد و بیان‌کننده پیشرفت بیماری و منعکس‌کننده نتیجه بیماری عمل می‌کنند(۸).

به‌عنوان مثال HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA) یک LncRNA انکوژنی است که در ناحیه HOXC روی کروموزوم12q قرار دارد که با متیلاسیون

**نویسنده مسئول:** بهزاد برادران
**پست الکترونیک:** *behzad_im@yahoo.com*



[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-14 ]

DNA و هیستون باعث خاموشی اپی ژنتیکی ژن‌های هدف از جمله HOXD و پیشرفت سیکل سلولی و سرطان می‌شود(۸, ۹). اولین بار نقش انکوژنی HOTAIR در سرطان پستان مورد توجه قرار گرفت و در مطالعه‌ای Gupta وهمکارانش گزارش کردند که سطح بیان این ژن در تومورهای اولیه سرطان پستان نسبت به سلول‌های غیر سرطانی اطراف آن‌ها بیان بالایی دارد(۱۰). HOTAIR همچنین در مرحله EMT دخالت می‌کند به‌طوری که تحقیق‌های مختلف نشان داده است که بیان بالای HOTAIR باعث مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود و بین سطح بیان HOTAIR و پیش آگهی بیماران ارتباط مستقیمی وجود دارد(۱۱). مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد که بیان HOTAIR در اکثر سرطان‌ها از جمله سرطان کولون، پستان معده، ریه و کلیه افزایش می‌یابد که در همه آن‌ها با پیش‌آگهی بد همراه بود(۱۲). در مطالعه‌هایی که روی بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال انجام شد نشان داده شد که بیان بالای HOTAIR با میزان تهاجم تومور- متاستاز به غدد لنفاوی و میزان تمایز پایین ارتباط مثبتی وجود دارد(۱۳, ۱۴). همچنین در مطالعه‌ای Svoboda M. et al. بیان بالای HOTAIR را در خون بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به افراد سالم نشان دادند(۱۵). هدف ما دراین مطالعه مورد-شاهدی مقایسه بیان کمی ژن HOTAIR در نمونه‌های توموری و حاشیه تومور بیماران سرطان کولورکتال بروش Real-time PCR است.

## مواد و روش‌ها:

### بیماران و جمع‌آوری نمونه‌ها

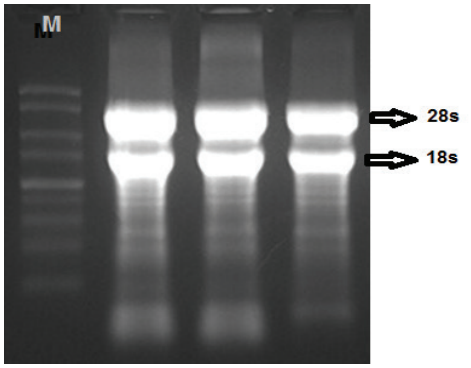
در این مطالعه مورد- شاهدی نمونه‌های بافتی توموری و حاشیه توموری (بافت سالم کنار تومور) از ۴۷ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال که از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۹۵در بیمارستان امام رضا (ع) شهر تبریز تحت جراحی قرار گرفته بودند به‌دست آمد. این بیماران قبل از جراحی تحت هیچ گونه جراحی، شیمی درمانی یا رادیوتراپی قرار نگرفته بودند. قبل از شروع کار از تمامی بیماران رضایت‌نامه کتبی اخذ شد. تمام نمونه‌های بافتی توموری و حاشیه توموری به‌وسیله پاتولوژیست تایید شد. دو نمونه ازهر بیمار (توموری و حاشیه آن) به اندازه ۰/۵ تا یک گرم هر کدام در یک لوله اپندروف استریل حاوی محلولی از RNase Later محصول شرکت Qiagenدر دمای ۸۰- نگهداری شد.

### استخراج Total RNA از نمونه ها و سنتز Complementary DNA (cDNA)

در آزمایشگاه ابتدا نمونه‌های مورد نظر برای استخراج RNA هموژنیزه شد و سپس با استفاده از محلول Trizol (ROUCHE) تمامیRNA نمونه‌ها به‌صورت دستی استخراج شد. اندازه‌گیری غلظت و کیفیت RNA نمونه‌ها به‌ترتیب با استفاده از دستگاه Nano Drop و ژل الکتروفورز انجام و سپس در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

کنترل کیفی RNA استخراج شده:

برای کنترل کیفیت و مطمئن شدن از سلامت RNA استخراج شده، مقدار ۳-۲ لاندا از آن را روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شد. برای مشاهده دو باند ۲۸s و ۱۸s مربوط به rRNAهای ریبوزومی از مارکر bp۵۰۰ از شرکت Fermentas استفاده کردیم . وجود باندهای شارپ نشانه سالم بودن RNA استخراج شده و عدم آسیب آن در روند استخراج بود. شکل یک نمونه ای از استخراج RNA بافت‌ها را




شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج شده از بافت‌ها روی ژل آگارز
(M: marker و 28S and 18s: mammalians ribosomal RNA)

برای تهیه اولین رشته از cDNA از روی RNA کل استخراج شده در مرحله قبل، از کیت با نام تجاری EXIQON استفاده شد. این کیت بر اساس آنزیم ترانسکریپتاز معکوس تهیه شده است. سنتز رشته cDNA به کمک پرایمر تصادفی هگزامر انجام شد که به‌صورت غیراختصاصی در نقاط مختلفی به رشته RNA اتصال می‌یابد و در نتیجه تمامی رشته‌های RNA ( اعم tRNA, LncRNA, mRNA, miRNA و rRNA) به عنوان الگوی سنتز استفاده می‌شوند. نمونه‌ها طبق برنامه EXIQON در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند تا cDNA ها سنتز شود. پس از اتمام سیکل‌ها تیوپ‌های مربوطه برای نگهداری، به فریزر ۸۰- منتقل شد.

### Quantitative real-time PCR

میزان بیان ژن HOTAIR و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی با استفاده از دستگاه Light Cycler ۹۶ و رنگ Syber green I تعیین شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Oligo7 طراحی و توسط شرکت Roche سنتز شد که در جدول زیر آورده شده است. لازم به ذکر است که برای هر نمونه دوبار تکرار در هر چرخه در نظر گرفته شد.

**توالی پرایمرهای استفاده شده برحسب طول قطعه و نام ژن**

| نام ژن | طول قطعه | توالی پرایمر |
|---|---|---|
| GAPDH | 127 | Forward: 5'CAAGATCATCAGCAATGCCTCC 3'<br>Reverse : 5'GCCATCACGCCAGTTTCC 3' |
| HOTAIR | 184 | Forward: 5′-CAAACGTGGCAGAGGGCAAGA-3 ′<br>Reverse: 5′-TCTCTGGGCGTTCATGTGGCGA-3′ |

پردازش اطلاعات در Real-time PCR بسیار حائز اهمیت است. پردازش بر اساس نمودار استاندارد و ارزیابی کارایی (Efficiency) PCR انجام می‌شود. برای ارزیابی کارایی هر ژن از شیب منحنی استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد برای هر ژن با استفاده از Ct محاسبه شده از رقت‌های سریالی محصولات آن ژن، در مقابل غلظت‌های لگاریتمی cDNA به‌دست آمده است. در مرحله بعد برای آنالیز داده‌ها ابتدا دلتا Ct ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن HOTAIR و Ct ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع محاسبه شد و بیان ژن‌ها در حالت پایه نسبت به ژن‌های مرجع با فرمول ΔCT −۲ محاسبه شد(). سپس نتایج نهایی بیان هر ژن (Expression ratio)، در دو بافت توموری و حاشیه آن توسط نرم افزار آنالیز شد. برای بررسی و محاسبه بیان ژن مورد نظر و Housekeeping gene و به‌دست آوردن نسبت آن‌ها از فرمول زیر استفاده شد و اساس آن بر پایه بازده و اختلاف درCt است:

Ct Target Gene (Tumor) – Ct Housekeeping Gene (Tumor) ΔCT (Tumor) =

ΔCT (Margin) = Ct Target Gene (Margin) – Ct Housekeeping Gene (margin)

Expression ratio = 2–ΔCT

### آنالیزهای آماری استفاده شده در این مطالعه:

با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، آنالیز آماری Unpaired t-Test با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism version ۶,۰۰ برای مطالعه میزان بیان ژن‌های HOTAIR و GAPDH در نمونه‌های تومور و حاشیه تومور انجام شد. برای بررسی ارتباط دو ژن از ضریب همبستگی Spearman استفاده شد. برای تمامی روابط P-value محاسبه شده و P<۰,۰۵ معنادار تلقی شد.

## یافته‌ها:

در این مطالعه ۴۷ نمونه توموری و حاشیه آن‌ها متعلق به ۲۱ زن و ۲۶ مرد بررسی شد. سن بیماران ۸±۵۸/۶ سال و در محدوده ۷۸-۴۶ سال بودند. ۴۰ درصد بیماران زیر ۵۵ سال و ۶۰ درصد بالای ۵۵ سال سن داشتند. از نظر ویژگی‌های کلنیکو پاتولوژیکی اکثر نمونه‌ها در Stage و گریدهای بالا بودند و اندازه بیشتر آن‌ها بالای سه سانتی‌متر بود. همچنین میزان متاستاز گره لنفاوی و تهاجم وریدی در بیشتر نمونه‌ها مثبت بود. مشخصات کلینیکوپاتولوریک بیماران در جدول زیر آورده شده است.

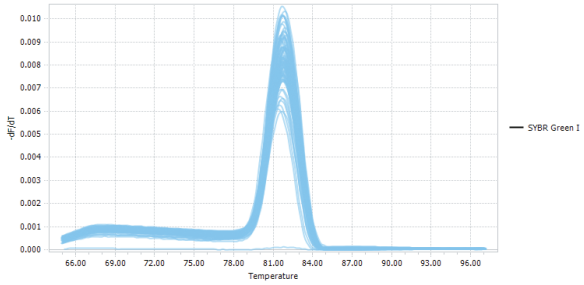
[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-14 ]

مشخصات کلینیکوپاتولوریک بیماران:

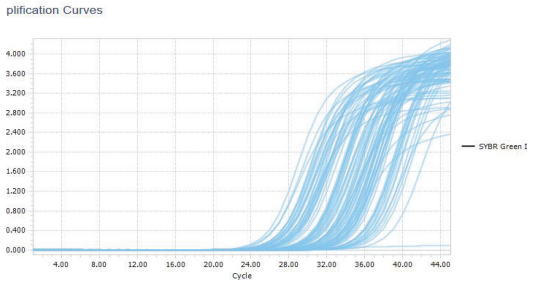
| مشخصات | طبقه بندی | تعداد | درصد |
|---|---|---|---|
| سن | ≤۵۵ | ۱۹ | ۴۰/۵ |
| | ۵۵≤ | ۲۸ | ۵۹/۵ |
| جنس | مونث | ۲۱ | ۴۴/۶ |
| | مذکر | ۲۶ | ۵۵/۴ |
| متاستاز گره لنفاوی | مثبت | ۳۰ | ۶۳/۸ |
| | منفی | ۱۷ | ۳۶/۲ |
| درجه تمایز یافتگی تومور | خوب | ۲۹ | ۶۱/۷ |
| | متوسط | ۱۷ | ۳۶/۳ |
| | ضعیف | ۸ | ۱۷ |
| عمق تومور | T۲ | ۵ | ۱۰/۶ |
| | T۳ | ۱۱ | ۲۳/۴ |
| | T۴ | ۳۱ | ۶۵ |
| تهاجم وریدی | مثبت | ۳۲ | ۶۸/۱ |
| | منفی | ۱۵ | ۳۱/۹ |
| Stage دسته‌بندی | II, III | ۱۷ | ۳۶/۲ |
| | IV, V | ۳۰ | ۶۳/۸ |
| متاستاز کبدی | مثبت | ۷ | ۱۴/۸ |
| | منفی | ۴۰ | ۸۵/۲ |
| سایز تومور | ≤۳ | ۶ | ۱۲/۷ |
| | ≥۳ | ۴۱ | ۸۷/۳ |

## نتایج واکنش Real-Time PCR برای ژن‌های مورد مطالعه:

برای بررسی میزان بیان ژن HOTAIR مقایسه آن در نمونه‌های تومورى و حاشیه تومور، واکنش Real-Time PCR انجام و از ctهای به دست آمده میانگین تهیه شد. در تمام نمونه‌ها، از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نمونه‌ای از منحنی‌های تکثیر هر ژن و همچنین منحنی‌های ذوب آن‌ها در زیر آورده شده است.



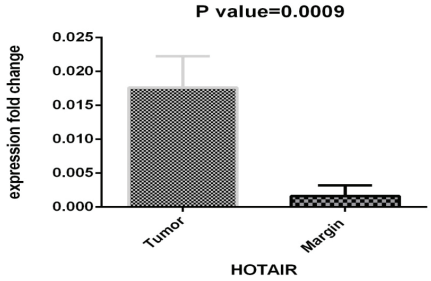

شکل۲-نمونه‌ای از منحنی ذوب ژن HOTAIR.




شکل۳-نمونه‌ای از منحنی تکثیر ژن HOTAIR.

## نتایج حاصل ازآنالیز آماری:

آنالیز مقادیرCt به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Graph pad Prism انجام شد و نتایج نشان داد که بیان HOTAIR در نمونه‌های تومورى نسبت به نمونه‌های حاشیه تومورى مقدار۶/۹ برابر افزایش داشت که با بازه اطمینان (Confidence interval) CI=95% ، P value=0.0009 به‌دست آمد. چون P< 0.05 است، تفاوت میانگین‌های HOTAIR در دو گروه تومورى و حاشیه تومورى معنادار است. همچنین میزان بیان ژن GAPDH هیچ تفاوتی در نمونه‌های تومورى و حاشیه تومور نداشت که نشان‌دهنده صحت انجام مراحل استخراج وPCR است.




شکل ۴- بررسی آماری تغییرات بیان HOTAIR مابین نمونه‌های تومورى و ماژینال

## نتایج حاصل از بررسی ارتباط بیان HOTAIR با مشخصات بالینی و پاتولوژیکی بیماران:

بررسی و مقایسه بیان ژن HOTAIR بر اساس علایم کلنیکو پاتولوژیکی مانند جنس- سن- متاستاز به غدد لنفاوی یا کبد- اندازه تومور- Stage و درجه تمایز تومورى نیز انجام شد. نتایج آنالیز نشان داد که در بین تمامی داده‌های کلنیکو پاتولوژیکی بیماران بررسی شده در این مطالعه، میزان بیان ژن HOTAIR تنها با با درجه تمایز تومورى ارتباط معناداری دارد (p=۰,۰۲۳) به گونه‌ای که میزان بیان با تمایز دارای رابطه عکس بوده و با افزایش درجه تمایز تومور میزان بیان ژن HOTAIR کاهش می‌یابد.

ارتباط بین بیان HOTAIR با مشخصات بالینی و پاتولوژیکی بیماران

| مشخصات کلینیکوپاتولوریک | P value |
|---|---|
| جنس | ۰,۸۶۱ |
| سن | ۰,۶۲۵ |
| متاستاز گره لنفاوی | ۰,۰۷۵۸ |
| درجه تمایز | ۰,۰۲۳ |
| اندازه تومور | ۰,۰۹۸۱ |
| متاستاز کبدی | ۰,۱۰۲۱ |
| Stage | ۰,۰۷۴۱ |

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-14 ]

## بحث:

سرطان کولورکتال (CRC) بالاترین میزان مرگ‌ومیر را در سراسر دنیا دارد و دلیل اصلی مرگ ناشی از سرطان در اروپا محسوب می‌شود. شناخت ژن‌ها و مسیرهای درگیر در CRC می‌تواند درتشخیص زود هنگام این بیماری و در نتیجه کاهش میزان مرگ‌ومیر موثر باشد(۱۶). بنابراین بررسی‌های بیشتر مولکولی برای شناسایی بیومارکرهای جدید برای پیشگیری، تشخیص زودهنگام، طبقه‌بندی بهتر بیماری و انتخاب روش درمانی ضروری است. از بیومولکول‌هایی که امروزه بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته، می‌توان به RNAهای غیر کد کننده (Non coding RNA) اشاره کرد که مطالعه‌های جدید نشان داده‌اند که نقش مهمی در پیشرفت سرطان و مقاومت به درمان دارند. HOTAIR یکی از مهم‌ترین RNA غیرکد کننده است که در این مطالعه میزان بیان آن در سلول‌های سرطانی کولورکتال و سلول‌های سالم مقایسه شد و نتایج نشان داد که میزان بیان آن در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم اطراف حدود ۷ برابر بیشتر است، بنابراین با بررسی‌های بیشتر می‌توان از این ژن به‌عنوان مارکر سلول‌های سرطانی و هدف‌گیری آن‌ها با داروهای خاص استفاده کرد.

فعالیت ژن HOTAIR در حالت طبیعی باعث خاموشی ژن‌های هدف با روش اپی‌ژنتیکی می‌شود و در موارد بیماری‌زایی و سرطان بیان آن افزایش می‌یابد. همچنین HOTAIR با افزایش بیان Eکادهرین و کاهش بیان ویمنتین و متالوپپتیداز۹ ماتریکس باعث تهاجم و درگیری غدد لنفاوی و متاستاز می‌شود(۱۷, ۱۸). مطالعه‌های مختلفی گزارش کرده‌اند که از HOTAIR می‌توان به‌عنوان بیومارکر در بررسی متاستاز غدد لنفاوی- پیش آگهی و درمان تومورها استفاده کرد. همچنین بیان HOTAIR در تومورهای اولیه و خون بالا می‌رود که با پیش آگهی ضعیف همراه است از این‌رو می‌توان از بیان بالای HOTAIR در خون به‌عنوان مارکر پیش آگهی کننده سرطان کولورکتال استفاده کرد(۱۹).

مشابه با مطالعه حاضر مطالعه‌های بسیاری برای ارزیابی میزان بیان HOTAIR بر روی بافت‌های سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پانکراس، سرطان معده، سرطان ریه و سرطان پستان انجام شده است که با وجود تفاوت‌هایی همچون جامعه آماری، نوع سرطان مورد بررسی، حجم نمونه مورد بررسی و ارتباط یافته‌های بالینی متفاوت، نکته اشتراک همگی بیان بالای ژن HOTAIR در همه آن‌هاست. در یک مطالعهKim و همکاران) ۲۰۱۳( میزان بیان ژنHOTAIR بافت پانکراس را در بیماران سرطانی و افراد سالم جامعه آمریکا را با روش Real-time PCR بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن در بافت پانکراس سرطانی شده نسبت به کنترل افزایش می‌یابد و همچنین با خاموشی این ژن در بافت سرطانی به‌وسیله siHOTAIR نشان دادند که HOTAIR نقش مهمی در پیشرفت سرطان پانکراس بازی می‌کند(۲۰). در مطالعه دیگر Liu و همکاران (۲۰۱۳) میزان بیان ژن HOTAIR را در سلول‌های سرطانی بافت ریه بررسی کردند که افزایش معناداری در بیان این ژن را گزارش کردند. همچنین با بررسی رده سلولی مربوط به این نوع سرطان به تاثیر افزایش بیان این ژن در حرکت و تهاجم سلول‌های متاستازی پی بردند(۲۱).

در یک بررسی مشابه دیگر عندانی و همکارانش ( ۲۰۱۴ ) تغییرات بیان ژن HOTAIR در بیماران مبتلا به سرطان معده درجامعه ایرانی را به روش Real-time PCR بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن در سرطان معده افزایش می‌یابد و همچنین میزان بیان آن با قدرت تهاجم ومتاستاز رابطه مستقیم دارد. در واقع این بررسی نیز همانند مطالعه ما نقش انکوژنیک ژن HOTAIR را تایید کرده اما در بررسی‌های بالینی تفاوت‌هایی را نسبت به مطالعه ما دارد. در بررسی حاضر بین بیان ژن HOTAIR و متاستاز رابطه‌ای مشاهده نشد، بلکه در بین ویژگی‌های بالینی بیماران بیان ژن فوق فقط با تمایز سلول‌های توموری ارتباط داشت. علت این تناقض می‌تواند متفاوت بودن بافت‌های مورد بررسی، حجم نمونه مورد بررسی یا تفاوت نژادی بین افراد در دو مطالعه اشاره کرد هرچند که هر دو بررسی در جغرافیای کشور ایران انجام شده‌اند اما بررسی ما در منطقه آذربایجان و بر روی ترک زبانان بوده که از نظر نژادی تفاوت‌های اساسی با سایر اقوام این کشور دارند. در کل مطالعه عندانی نیز مانند مطالعه ما نقش پیش‌برنده بیان HOTAIR در سرطان را تایید می‌کند(۲۲).

Nie و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای نقش میزان بیان ژن HOTAIR در توسعه و بقای سرطان سر و گردن را در ۱۶۰ نمونه بافت سرطانی و غیر سرطانی منجمد شده در پارافین و ۲۰ نمونه سالم و سرطانی تازه منجمد شده را باهم مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که بیان این ژن در بافت سرطانی بیشتر از سالم است و موجب افزایش پتانسیل تهاجم و متاستاز می‌شود. بیان بالای ژن HOTAIR در مطالعه ما با تمایز پایین سلول‌های سرطانی در ارتباط بوده است و سلول‌های کمتر تمایز یافته تمایل بیشتری به تهاجم دارند. با در نظر گرفتن حجم نمونه کمتر ما نسبت به مطالعه Nie وهمکارانش به نظر می‌رسد اگر مطالعه در حجم متفاوت‌تری انجام گیرد، نتایج بالینی مشابهی به دست می‌آید(۲۳).

همچنین در مطالعه حاضر سطح بیان نسبی ژن HOTAIR در نمونه‌های توموری و حاشیه توموری هر فرد ارزیابی شد و ارتباط معناداری در رابطه با تغییر بیان این ژن در نمونه‌های توموری نسبت به بافت حاشیه آن با۰/۰۰۰۹ P value=دیده شد که حاکی از نقش بسیار مهم این ژن در سرطان کولورکتال است. همچنین بین ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیکی و تغییرات بیان ژن HOTAIR تنها ارتباط معنادار مشاهده شده ارتباط بین این ژن و تمایز سلول‌های سرطانی بود که در نمونه‌های با تمایز کمتر میزان بیان این ژن بالاتر بود. بین میزان بیان ژن HOTAIR و سایر شاخصه‌های پاتولوژیک بیماران رابطه معناداری در این مطالعه یافت نشد.

همان‌طور که بیان شد همانند مطالعه حاضر در مطالعه‌های انجام شده بر روی بافت‌های سرطان‌های مختلف از جمله: سرطان پانکراس، سرطان معده، سرطان شش، سرطان سر و گردن و سرطان پستان، افزایش بیان ژن HOTAIR وجود داشت. همچنین در مطالعه‌های انجام شده بر روی جمعیت‌های متفاوت، ارتباطاتی بین افزایش بیان ژن مذکور و مراحل پاتولوژیکی پیشرفته توموری و سایر پارامترهای کلینیکوپاتولوژیکی مشاهده شده که نشان می‌دهند ژن HOTAIR علاوه بر نقشی که در تومورزایی دارد ، یک فاکتور یا بیومارکر مولکولی پیش آگهی دهنده پیامدهای نامطلوب سرطان نیز می‌تواند باشد. علاوه بر همسویی کلی مطالعه‌ها با مطالعه حاضر در رابطه با ارتباط ویژگی‌های کلینیکی بیماران با بیان ژن HOTAIR در این مطالعه با سایر مطالعه‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد که با توجه به تفاوت در نوع بافت، جامعه بررسی شده، حجم نمونه و طراحی مطالعه‌های مورد اشاره با مطالعه حاضر این تفاوت‌ها قابل توجیه است.

## نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه افزایش قابل توجه معناداری در سطح بیان انکوژن HOTAIR را در سلول‌های سرطانی کولورکتال نسبت به سلول‌های سالم نشان داد که می‌تواند بیانگر نقش احتمالی این ژن در پاتوژنز این سرطان باشد و ممکن است از آن به عنوان بیومارکر برای تمایز این دو گروه سلولی از هم به‌کار گرفته شود. همچنین به دلیل ارتباط معنادار بیان ژن HOTAIR با اطلاعات کلینیکوپاتولوژیکی (تمایز سلول‌های توموری ) شاید ژن بررسی شده می‌تواند جایگزینی برای روش‌های پاتولوژیکی باشد. با این وجود نمی‌توان ارزش ژن مذکور را به عنوان مارکرهای پیش آگهیدهنده به طور کلی تایید کرد و برای رسیدن به یک نتیجه قاطع نیاز به بررسی‌های بیشتر با تعداد نمونه بیشتری است.

[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-14 ]

## منـابع:


1. merican Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019.

2. Ernst J. Kuipers WMG, David Lieberman, Thomas Seufferlein,, Joseph J. Sung PGB, Cornelis J. H. van de Velde and Toshiaki Watanabe. 2015. NATURE REVIEWS. Colorectal cancer;1.

3. Alhurry AMAH, Rezaianzadeh A, Rahimikazerooni S, Akool MA, Bahrami F, Shahidinia SS, et al. A Review of the Incidence of Colorectal Cancer in the Middle East. Annals of Colorectal Research. 2017(In Press).

4. Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: a review. Arch Iran Med. 2009;12(2):161-9.

5. Rezaianzadeh A, Safarpour AR, Marzban M, Mohaghegh A. A systematic review over the incidence of colorectal cancer in Iran. Annals of colorectal research. 2015;3(1).

6. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. Annals of gastroenterology. 2014;27(1):9.

7. Saus E, Brunet-Vega A, Iraola-Guzmán S, Pegueroles C, Gabaldón T, Pericay C. Long non-coding RNAs as potential novel prognostic biomarkers in colorectal cancer. Frontiers in genetics. 2016;7:54.

8. Xie X, Tang B, Xiao Y-F, Xie R, Li B-S, Dong H, et al. Long non-coding RNAs in colorectal cancer. Oncotarget. 2016;7(5):5226.

9. Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. Gastroenterology. 2015;149(5):1204-25. e12.

10. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. Nature. 2010;464(7291):1071.

11. Yang Y, Junjie P, Sanjun C, Ma Y. Long non-coding RNAs in Colorectal Cancer: Progression and Future Directions. Journal of Cancer. 2017;8(16):3212.

12. Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. Cancer biology & medicine. 2015;12(1):1.

13. Wu Z-H, Wang X-L, Tang H-M, Jiang T, Chen J, Lu S, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. Oncology reports. 2014;32(1):395-402.

14. Luo Z-F, Zhao D, Li X-Q, Cui Y-X, Ma N, Lu C-X, et al. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer. World journal of gastroenterology. 2016;22(22):5254.

15. Svoboda M, Slyskova J, Schneiderova M, Makovicky P, Bielik L, Levy M, et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. Carcinogenesis. 2014;35(7):1510-5.

16. Pagnotta SM, Laudanna C, Pancione M, Sabatino L, Votino C, Remo A, et al. Ensemble of gene signatures identifies novel biomarkers in colorectal Cancer activated through PPARγ and TNFα signaling. PloS one. 2013;8(8):e72638.

17. Luo J, Qu J, Wu D-K, Lu Z-L, Sun Y-S, Qu Q. Long non-coding RNAs: a rising biotarget in colorectal cancer. Oncotarget. 2017;8(13):22187.

18. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. International journal of molecular sciences. 2017;18(1):197.

19. Wang J, Song Y-X, Ma B, Wang J-J, Sun J-X, Chen X-W, et al. Regulatory roles of non-coding RNAs in colorectal cancer. International journal of molecular sciences. 2015;16(8):19886-919.

20. Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, et al. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. Oncogene. 2013;32(13):1616.

21. Liu X-h, Liu Z-l, Sun M, Liu J, Wang Z-x, De W. The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer. BMC cancer. 2013;13(1):464.

22. Emadi-Andani E, Nikpour P, Emadi-Baygi M, Bidmeshkipour A. Association of HOTAIR expression in gastric carcinoma with invasion and distant metastasis. Advanced biomedical research. 2014;3.

23. Nie Y, Liu X, Qu S, Song E, Zou H, Gong C. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival. Cancer science. 2013;10, 64-458:(4)4


[ Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-14 ]