

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

Seyed Rafi Bahavarnia<sup>1</sup>, Habib Onsori<sup>2</sup>, Behzad Baradaran<sup>\*3</sup>

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

\* Corresponding author: : Behzad Baradaran  
E-mail: behzad\_im@yahoo.com

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

سید رفیع بهاورنیا<sup>۱</sup>، حبیب عنصری<sup>۲</sup>، بهزاد برادران<sup>۳\*</sup>

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 و هدف:** با وجود پیشرفتهای زیاد در زمینه سرطان، هنوز سرطان کولورکتال (CRC) به عنوان سومین شایع بالاترین میزان مرگ و میر را دارد. با توجه به شیوع بالای آن در سنین پایین و مراحل پیشرفته تر غربالگری و درمان این سرطان با روش های مولکولی ضروری است. مطالعه ها نشان داده اند که ژن HOTAIR در سرطان های مختلف نقش مهمی دارد. هدف ما در این مطالعه بررسی بیان ژن HOTAIR در نمونه های توموری و حاشیه توموری بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال به روش Real-Time PCR است.

**مواد و روش بررسی:** در این مطالعه مورد - شاهدهی ۴۷ بیمار مبتلا به سرطان کولورکتال مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا (ع) شهر تبریز از اردیبهشت تا اسفند ۱۳۹۵ بررسی شدند. بعد از تایید پاتولوژیکی نمونه ها و استخراج RNA، بیان ژن HOTAIR به روش Real time-PCR اندازه گیری و با نرم افزار Graph pad Prism آنالیز شد.

**یافته ها:** سطح بیان ژن HOTAIR در نمونه های توموری نسبت به نمونه های مارژینال حدود ۷ برابر بیشتر بود ( $p=0/0009$ ). همچنین با افزایش درجه تمایز تومور میزان بیان ژن HOTAIR کاهش می یابد ( $p=0/023$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج ما نشان می دهد که ژن HOTAIR در پاتوژنز سرطان کولورکتال دخالت دارد و استفاده از آنالیز بیانی این ژن به عنوان بیومارکر می تواند در تشخیص، درمان و پیش آگهی این بیماران مفید باشد، هر چند برای تایید این ادعا به مطالعه ها و بررسی های بیشتری نیاز است.

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

### مقدمه:

زیادی قرار گرفته است. به خصوص روش های غیر تهاجمی که به عنوان استاندارد طلایی غربالگری سرطان کولورکتال مطرح شده است (۲).

سرطان کولورکتال یک بیماری هتروژن است و تجمع تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی در سلول های اپی تلیال کولون باعث ایجاد سرطان می شود (۴). مطالعه ها نشان داده اند که نسبت زیادی از این تغییرات اپی ژنتیکی در نواحی غیر کد کننده ژنوم که شامل مناطق RNA های 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 آن ها به عنوان بیومارکرهای جدید برای تشخیص - پیش آگهی و جواب به درمان سرطان کولورکتال شده است. این RNA ها پروفایل بیانی منحصربفردی در سرطان های مختلف نشان می دهد و بیان کننده پیشرفت بیماری و منعکس کننده نتیجه بیماری عمل می کنند (۸).

به عنوان مثال HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA) یک LncRNA انکوژنی است که در ناحیه HOXC روی کروموزوم 12q قرار دارد که با متیلاسیون

سرطان کولورکتال به عنوان سرطان اصلی در دنیا شناخته شده است که ۹٫۷ درصد همه سرطان ها را شامل می شود و سومین سرطان شایع در هر دو جنس است به طوری که از هر ۲۲ مرد یا ۲۴ زن یک نفر در طول زندگی خود به سرطان کولورکتال مبتلا می شود. ۱۰ درصد مرگ های ناشی از سرطان در کشورهای غربی به علت سرطان کولورکتال است که در سال های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۳ حدود ۷۵ درصد افزایش یافته است (۱، ۲). ناحیه خاورمیانه گرچه به عنوان منطقه کم خطر برای سرطان کولورکتال محسوب می شود، ولی در مقایسه با کشورهای غربی بیماران در سنین پایین تری مبتلا می شوند. در ایران گرچه فراوانی سرطان کولورکتال پایین است ولی یک افزایش واضح و خفیف در میزان آن مشاهده می شود به طوری که ۳٫۶ درصد مرگ های ناشی از سرطان در ایران را به خود اختصاص داده است (۳-۵). با وجود پیشرفت های 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 اندوم اولیه منشأ می گیرد برنامه های غربالگری مورد توجه

نویسنده مسئول: بهزاد برادران

پست الکترونیکی: behzad\_im@yahoo.com

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 به صورت غیراختصاصی در نقاط مختلفی به رشته RNA اتصال می‌یابد و در نتیجه تمامی رشته‌های RNA (اعم از mRNA، miRNA، LncRNA، rRNA، و tRNA) 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' Reverse: 5'GCCATCACGCCAGTTTCC 3'
HOTAIR	184	Forward: 5'-CAAACGTGGCAGAGGGCAAGA-3' Reverse: 5'-TCTCTGGCGTTCATGTGGCGA-3'

پردازش اطلاعات در Real-time PCR بسیار حائز اهمیت است. پردازش بر اساس نمودار استاندارد و ارزیابی کارایی (PCR Efficiency) 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 به دست 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  $2^{-\Delta CT}$  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 به دست آوردن نسبت آن‌ها از فرمول زیر استفاده شد و اساس آن بر پایه بازده و اختلاف در Ct است:

$$\Delta CT (\text{Tumor}) = Ct \text{ Target Gene (Tumor)} - Ct \text{ Housekeeping Gene (Tumor)}$$

$$\Delta CT (\text{Margin}) = Ct \text{ Target Gene (Margin)} - Ct \text{ Housekeeping Gene (margin)}$$

$$\text{Expression ratio} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

#### آنالیزهای آماری استفاده شده در این مطالعه:

با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، آنالیز آماری Unpaired t-Test با استفاده از نرم افزار 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  $P < 0,05$  معنادار تلقی شد.

#### یافته‌ها:

در این مطالعه ۴۷ نمونه توموری و حاشیه آن‌ها متعلق به ۲۱ زن و ۲۶ مرد بررسی شد. سن بیماران  $8 \pm 58/6$  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 کلینیکو 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 کلینیکوپاتولوژیک بیماران در جدول زیر آورده شده است.

DNA و هیستون باعث خاموشی اپی ژنتیکی ژن‌های هدف از جمله HOXD و پیشرفت سیکل سلولی و سرطان می‌شود (۸، ۹). اولین بار نقش آنکوژنی HOTAIR در سرطان پستان مورد توجه قرار گرفت و در مطالعه‌ای Gupta و همکارانش 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 به طوری 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 پیش آگهی 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 Svboda M. et al. بیان بالای HOTAIR را در خون بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال نسبت به افراد سالم نشان دادند (۱۵). هدف ما در این مطالعه مورد-شاهدی مقایسه بیان کمی ژن HOTAIR در نمونه‌های توموری و حاشیه تومور بیماران سرطان کولورکتال بر روش Real-time PCR است.

#### مواد و روش‌ها:

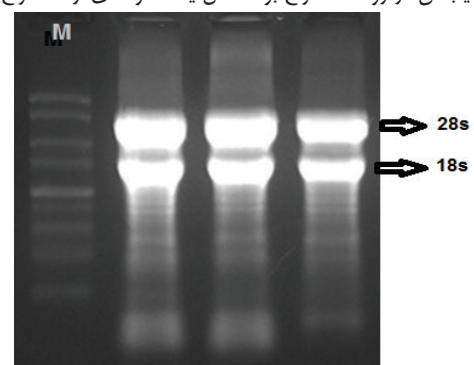
#### بیماران و جمع‌آوری نمونه‌ها

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 ۱۳۹۵ در بیمارستان امام رضا (ع) شهر تبریز تحت جراحی قرار گرفته بودند به دست 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 به وسیله پاتولوژیست تایید شد. دو نمونه از هر 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 Qiagen در دمای -۸۰ نگهداری شد.

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

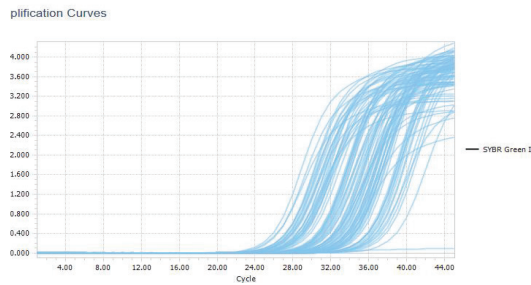
در آزمایشگاه ابتدا نمونه‌های مورد نظر برای استخراج RNA هموژنیزه شد و سپس با استفاده از محلول Trizol (ROUCHE) تمامی RNA نمونه‌ها به صورت دستی استخراج شد. اندازه‌گیری غلظت و کیفیت RNA نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از دستگاه Nano Drop و ژل الکتروفورز انجام و سپس در دمای -۸۰ نگهداری شدند. کنترل کیفی RNA استخراج شده:

برای کنترل کیفیت و مطمئن شدن از سلامت RNA استخراج شده، مقدار ۲-۳ لانداز آن را روی ژل آگارز ۵درصد الکتروفورز شد. برای مشاهده دو باند ۲۸s و ۱۸s مربوط به rRNAهای ریپوزومی از مارکر ۵۰۰ bp 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 (28S and 18s: mammalian ribosomal RNA و M: marker)

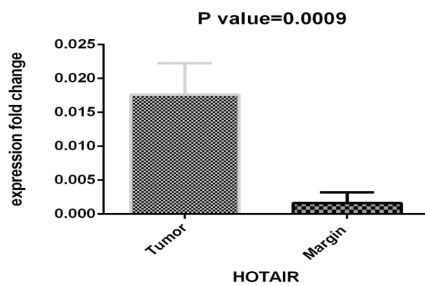
مشخصات کلینیکی پاتولوژیک بیماران:



شکل ۳- نمونه‌های از منحنی تکثیر ژن HOTAIR.

نتایج حاصل از آنالیز آماری:

آنالیز مقادیر Ct به دست آمده با استفاده از نرم افزار Graph pad Prism انجام شد و نتایج نشان داد که بیان HOTAIR در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های حاشیه توموری مقدار ۶/۹ برابر افزایش داشت که با بازه اطمینان (Confidence interval) CI=95% ، P value=0.0009 به دست آمد. چون P< 0.05 است، تفاوت میانگین‌های HOTAIR در دو گروه توموری و حاشیه توموری معنادار است. همچنین میزان بیان ژن GAPDH هیچ تفاوتی در نمونه‌های توموری و حاشیه تومور نداشت که نشان‌دهنده صحت انجام مراحل استخراج PCR است.



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

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

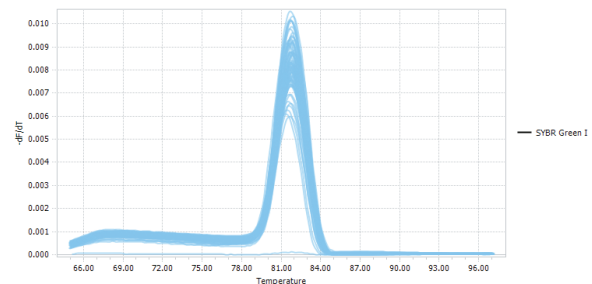
بررسی و مقایسه بیان ژن HOTAIR بر اساس علائم کلینیکی پاتولوژیکی مانند جنس- سن- متاستاز به غدد لنفاوی یا کبد- اندازه تومور- Stage و درجه تمایز توموری نیز انجام شد. نتایج آنالیز نشان داد که در بین تمامی داده‌های کلینیکی پاتولوژیکی بیماران بررسی شده در این مطالعه، میزان بیان ژن HOTAIR تنها با درجه تمایز توموری ارتباط معناداری دارد (p=0,023) 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 کلینیکی پاتولوژیک	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

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 توموری و حاشیه تومور، واکنش Real-Time PCR انجام و از تهای 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.



شکل ۲- نمونه‌های از منحنی ذوب ژن HOTAIR.

**بحث:**

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 و همکارانش 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 با  $P \text{ value} = 0.009$  دیده شد که حاکی از نقش بسیار مهم این ژن در سرطان کولورکتال است. همچنین بین ویژگی‌های کلینیکیپاتولوژیکی 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 کلینیکیپاتولوژیکی مشاهده شده که نشان می‌دهند ژن HOTAIR علاوه بر نقشی که در تومورزایی دارد، یک فاکتور یا بیومارکر مولکولی پیش‌آگهی 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 به کار گرفته شود. همچنین به دلیل ارتباط معنادار بیان ژن HOTAIR با اطلاعات کلینیکیپاتولوژیکی (تمایز سلول‌های توموری) شاید ژن بررسی شده می‌تواند جایگزینی برای روش‌های پاتولوژیکی باشد. با این وجود نمی‌توان ارزش ژن مذکور را به عنوان مارکرهای پیش‌آگهی‌دهنده به طور کلی تایید کرد و برای رسیدن به یک نتیجه قاطع نیاز به بررسی‌های بیشتر با تعداد نمونه بیشتری است.

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 در تشخیص زود هنگام این بیماری و در نتیجه کاهش میزان مرگ‌ومیر موثر باشد (۱۶). بنابراین بررسی‌های بیشتر مولکولی برای شناسایی بیومارکرهای جدید برای پیشگیری، تشخیص زود هنگام، 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 غیر کد 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 به عنوان 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 متالوپپتیداز ۹ ماتریکس باعث تهاجم و درگیری غدد لنفاوی و متاستاز می‌شود (۱۷، ۱۸). مطالعه‌های مختلفی گزارش کرده‌اند که از HOTAIR می‌توان به عنوان بیومارکر در بررسی متاستاز غدد لنفاوی- پیش‌آگهی و درمان تومورها استفاده کرد. همچنین بیان HOTAIR در تومورهای اولیه و خون بالا می‌رود که با پیش‌آگهی ضعیف همراه است از این رو می‌توان از بیان بالای HOTAIR در خون به عنوان مارکر پیش‌آگهی 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 مطالعه Kim و همکاران (۲۰۱۳) میزان بیان ژن HOTAIR 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 به وسیله 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 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 در جامعه 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 و متاستاز 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

## منابع:

1. American 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, Bishhehsari 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 PPAR $\gamma$  and TNF $\alpha$  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;104:458(4)