

Investigating the effects of buforin II coding gene on the expression of lncRNAs PVT1, EGOT and LINC00312 in kidney cancer cell line

Maryam Amiri-Farsani¹ , Abbas Doosti^{2*} 

¹Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

²Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: Oct. 01, 2023
Revised: Dec. 14, 2023
Accepted: Jan. 08, 2024
Published Online: Jun. 15, 2024

* **Correspondence to:**
Abbas Doosti
Biotechnology Research
Center, Shahrekord Branch,
Islamic Azad University,
Shahrekord, Iran
Email:
bio.gene84@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Renal cell carcinoma (RCC) is the most common type of kidney cancer in adults. The aim of this study is to investigate the effects of the buforin II gene on the expression of lncRNAs PVT1, EGOT and LINC00312 in ACHN kidney cancer cells.

Material & Methods: Recombinant plasmid pcDNA3.1(+) containing buforin II gene and empty plasmid pcDNA3.1(+) were introduced into E.coli strain TOP10 by heat shock method and then purified. Then both mentioned plasmids were introduced into ACHN cells by lipofection method and screening was done by neomycin antibiotic. Finally, real time RT-PCR reaction was performed in order to investigate the expression change of EGOT, PVT1 and LINC00312 lncRNAs.

Results: After lipofection, the transfected cells grew in the culture medium containing neomycin antibiotic. The real time RT-PCR reaction showed that the expression of buforin II gene in ACHN kidney cancer cells caused a significant increase in the expression of lncRNAs EGOT (P=0.0033) and LINC00312 (P=0.0272) and a significant decrease in the expression of PVT1 (P=0.0278).

Discussion & Conclusion: Considering that the presence of buforin II gene causes a significant change in the expression of lncRNAs EGOT, PVT1 and LINC00312, it is possible that it can activate cell pathways including apoptosis.

Keywords: Renal cell carcinoma, buforin II, ACHN cell line

How to cite this paper

Amiri-Farsani M, Doosti A. Investigating the effects of buforin II coding gene on the expression of lncRNAs PVT1, EGOT and LINC00312 in kidney cancer cell line. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2024;32(2): 32-43.



بررسی آثار ژن کدکننده buforin II بر بیان lncRNAهای PVT1، EGOT و LINC00312 در رده سلولی سرطان کلیه

مریم امیری فارسانی^۱، عباس دوستی^{۲*}

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه: کارسینوم سلول کلیوی (RCC) شایع‌ترین نوع سرطان کلیه در بزرگسالان است. هدف از مطالعه حاضر بررسی آثار ژن کدکننده buforin II بر بیان lncRNAهای PVT1، EGOT و LINC00312 در سلول‌های سرطان کلیه رده ACHN است.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶

مواد و روش‌ها: پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1 (+) حاوی ژن buforin II و پلاسمید خالی pcDNA3.1 (+) به روش شوک حرارتی وارد باکتری E.coli سویه TOP10 شدند و سپس تخلیص گردیدند. پس از آن، هر دو پلاسمید به روش لیپوفکشن وارد سلول‌های ACHN شدند و غربالگری توسط آنتی‌بیوتیک نئومایسین انجام گرفت. در نهایت، واکنش real time RT-PCR به منظور بررسی تغییر بیان lncRNAهای EGOT، PVT1 و LINC00312 انجام گردید.

نویسنده مسئول:

عباس دوستی

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی،

واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد

اسلامی، شهرکرد، ایران

یافته‌های پژوهش: پس از لیپوفکشن، سلول‌های ترانسفکت شده در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین رشد کردند. واکنش real time RT-PCR نشان داد که بیان ژن buforin II در سلول‌های سرطان کلیه رده ACHN سبب افزایش بیان معنی‌دار lncRNAهای EGOT (P= 0.0033) و LINC00312 (P= 0.0272) و کاهش بیان معنی‌دار PVT1 (P=0.0278) شد.

Email:

bio.gene84@gmail.com

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه حضور ژن buforin II باعث تغییر بیان معنی‌دار lncRNAهای EGOT، PVT1 و LINC00312 می‌شود، احتمال می‌رود که بتواند مسیرهای سلولی از جمله آپتوزیز را فعال کند.

واژه‌های کلیدی: کارسینوم سلول کلیه، buforin II، رده سلولی ACHN

استناد: امیری فارسانی مریم، دوستی عباس. بررسی آثار ژن کدکننده buforin II بر بیان lncRNAهای PVT1، EGOT و LINC00312 در رده

سلولی سرطان کلیه. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۳؛ ۳۲(۲): ۳۲-۴۳.



مقدمه

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که در نهایت، زائیده آثار عوامل محیطی است. در سال ۲۰۱۰، بیش از ۱۴,۰۰۰,۰۰۰ نفر به سرطان مبتلا و در حدود ۷,۰۰۰,۰۰۰ یعنی ۵۰ درصد از آن‌ها دچار مرگ شدند. از سال ۲۰۱۱ به بعد، سرطان از نظر مرگ‌ومیر رتبه اول جهانی را داشته است، در حالی که پیش از آن، بیماری‌های قلب و عروق مقام اول را به خود اختصاص می‌داد (۱). سرطان‌ها به علت نبود عملکرد صحیح DNA در سلول‌ها پدید می‌آیند و در واقع، علت اصلی آن به سبب تغییرات و اختلالاتی است که در ژن‌های دخیل در کنترل رشد سلول‌ها به وجود می‌آیند (۲). سرطان کلیه شایع ترین بدخیمی دستگاه ادراری است و نوع اپیتلیوم کلیوی با نام کارسینوم سلولی کلیه یا RCC بیشترین آمار ابتلا را دارد. RCC به ترتیب نهمین و چهاردهمین سرطان رایج در مردان و زنان و شانزدهمین علت مرگ بر اثر سرطان در سرتاسر جهان است. با توجه به پیشرفت برنامه‌های غربالگری بیماران مبتلا به RCC مشخص شده است که شیوع این سرطان در جهان در حال افزایش است. بالاترین میزان بروز را می‌توان در کشور های توسعه یافته و اغلب اروپای شمالی و شرقی و آمریکای شمالی یافت (۳-۵). در ایالات متحده، در هر سال ۶۴,۰۰۰ مورد جدید RCC و ۱۴,۰۰۰ مرگ‌ومیر ناشی از RCC وجود دارد. عوامل مهمی که در این بیماری نقش دارند؛ عبارت‌اند از: نژاد، سن و جنسیت. در مردان بالای ۶۰ سال RCC شایع تر است و بیشترین میزان آن در دهه‌های ۶۰ تا ۸۰ زندگی است (۳). به علت موارد یادشده، کنترل و درمان RCC مورد توجه دانشمندان قرار دارد (۴). سرطان کلیه بیماری پیچیده‌ای است که در آن، بیان ژن به صورت نامتعادل صورت می‌گیرد. شواهد نشان داده‌اند که بخش چشم‌گیری از عامل‌های مستعدکننده به سرطان را نمی‌توان به تغییر در توالی‌های کدکننده پروتئین نسبت داد. شناسایی شمار بسیاری از lncRNAها در انسان به پرده‌برداری از جایگاه این مولکول‌ها در آسیب‌شناسی سرطان و نقش آن‌ها به عنوان اجزای مهم در تومورزایی، کمک شایانی کرده است. lncRNA رونوشت انتوزنی گرانول اتوزینوفیل (EGOT) در p26.1۳ قرار دارد.

مطالعات نشان داده است که EGOT در پاسخ به سیگنال‌های استرس القا می‌شود و به عنوان تنظیم‌کننده مثبت مسیرهای NF-kB و PI3K/AKT عمل می‌کند (۵). LINC00312 که به نام NAG7 نیز نامیده می‌شود، به عنوان یک ژن جدید سرکوبگر تومور در انواع مختلف سرطان، شناسایی شده است (۶). PVT1 به عنوان یک انکوژن شناسایی شده است و همچنین در متاستاز RCC افزایش بیان دارد (۷). علی‌رغم پیشنهادها و درمان‌های اخیر به منظور درمان این سرطان، میزان عود تومور بسیار است که به همین علت شیمی‌درمانی نیز استفاده می‌گردد؛ بنابراین، برای درمان سرطان و همچنین کاهش عود آن، نیاز چشمگیر به فناوری‌های جدید وجود دارد. بیشتر پپتیدهای ضدسرطانی به طور انتخابی سلول‌های سرطانی را می‌کشند، به این صورت که با اختلال در غشای سلول یا نفوذ و تورم در میتوکاندری سلول، سبب مرگ سلول سرطانی می‌شوند. اعتقاد بر این است که با جذب الکترواستاتیکی میان اجزای غشای (با بار منفی) سلول های سرطانی و پپتیدهای ضدسرطان کاتیونی، فرایند مرگ سلولی کلید می‌خورد (۸). buforin II یک پپتید ضد میکروبی قوی با ۲۱ آمینواسید است که در یک محیط آب‌گریز، یک ساختار آمفی‌پاتیک متشکل از یک ناحیه سیم‌پیچ تصادفی ترمینال N، یک ناحیه ماریپیچ، یک لولا و یک منطقه آلفا هلیکس در C ترمینال تشکیل می‌دهد (۹) و به طور انتخابی، سلول‌های سرطانی را از طریق تعامل با گانگلیوزیدهای سطح سلولی هدف قرار می‌دهد؛ سپس buforin II غشای سلول‌های سرطانی را بدون آسیب رساندن به آن‌ها طی می‌کند و آپوپتوز وابسته به میتوکاندری را القا می‌نماید (۱۰).

با توجه به رشد روزافزون مبتلایان به سرطان، شناسایی مسیرهای مختلف برای کنترل و درمان این بیماری نیاز مبرم جامعه جهانی است؛ بدین علت، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ژن buforin II در تغییر بیان lncRNAهای PVT1، EGOT و LINC00312 در سلول‌های رده سرطانی کلیه است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با کد اخلاق

باید توجه داشت همه تیک‌ها علامت بخورند و سپس Quarry BY Gene انتخاب گردید و نام ژن نوشته و گزینه Quarry انتخاب شد. بدین ترتیب اسامی lncRNAهای به دست آمده در پایگاه داده Cbioportal کپی گردید و lncRNAهایی که بالاترین Alternation را داشتند، کاندید شدند. فرمت FASTA هر lncRNA به پایگاه داده LncDisease داده شد و lncRNAهای دارای پروفایل بیانی بالاتر انتخاب گردید.

مواد، باکتری، سلول و کیت‌ها: در این مطالعه، پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II و پلاسمید دست نخورده (خالی) pcDNA3.1(+) از شرکت Generay Biotech Co. Ltd چین سفارش داده شد و تهیه گردید. توالی ژن هدف buforin II (با طول ۸۷ جفت باز) در ناحیه EcoRI-XbaI کلون شد و برای بیان بهتر در میزبان یوکاریوتی توسط این شرکت بهینه‌سازی کدون صورت پذیرفت. صحت سنتز ژن‌های هدف با هضم آنزیمی توسط شرکت سازنده تأیید گردید؛ همچنین از باکتری E. coli سویه TOP10 برای تکثیر پلاسمیدهای نامبرده بهره گرفته شد. شایان ذکر است که کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای تخلیص پلاسمیدها از باکتری E. coli به کار رفت. سلول رده سرطان کلیه با نام ACHN (بانک سلولی ایران) برای انجام مطالعات آزمایشگاهی استفاده گردید. برای انجام واکنش PCR و real time RT-PCR، از مواد و واکنش‌گرهای شرکت یکتا تجهیز آزما بهره گرفته شد.

تکثیر و استخراج و کتور نو ترکیب: باکتری E. coli سویه TOP10 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری و در محیط کشت Luria-Bertani (LB) (مرک، آلمان) کشت گردید و سپس به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه شد. پلاسمید نو ترکیب نامبرده و پلاسمید خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) و شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتی‌گراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم گردید. کلونی‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB آگار، حاوی آمپی‌سیلین (۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. صحت انجام ترانسفورماسیون با

IR.IAU.SHK.REC.1402.014 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

مطالعات in silico: به منظور شناسایی پروفایل بیانی ژن‌های دخیل در پیشرفت و پاتوژنیز سرطان کلیه، از پایگاه‌های داده آنالین استفاده شد. برای این هدف، با استفاده از پایگاه داده OMIM (omim.org) داده‌های سرطان کلیه دانلود گردید. OMIM یک پایگاه داده برای ژن‌های انسانی و اختلالات ژنتیکی است و اطلاعات همه آنالیزهای کلینیکی معتبر در این سایت ادغام شده‌اند؛ به عنوان مثال، پس از جستجوی واژه کلیدی سرطان کلیه در این سایت، اطلاعات به شکل فایل اکسل دانلود گردید که در این فایل هم می‌توان به ID ژن‌ها و هم به نام ژن‌های دخیل در سرطان کلیه دسترسی داشت. در سرطان کلیه ۸۶۱۴ مورد نتیجه یافت شد. در ادامه، IDهای به دست آمده از مرحله پیش در سایت enrichr جستجو و عملکرد ژن‌ها بررسی گردید. ژن‌های دخیل در پیشرفت و پاتوژنیز سرطان کلیه کاندید شدند؛ سپس از پایگاه داده HUGO (genename) استفاده گردید. این سایت یک مجموعه از سازمان ژنوم انسانی است که استانداردهای نام‌گذاری ژن‌های انسانی را تعیین می‌کند. در ادامه، مسیر کاندید کردن lncRNA از این سایت استفاده شد، به این صورت که از بخش lncRNA وارد بخش Gene symbols گردید و در بخش biomart lncRNA انتخاب شد و سپس گزینه Gene انتخاب گردید. در این قسمت، با IDهای مختلف فیلتر صورت گرفت؛ از جمله: Locus group = non-coding و Locus type = lncRNA. در نهایت، در بخش OMIM ID اسامی lncRNAهای مدنظر نوشته شد و گزینه GO انتخاب و نام استاندارد ژن‌ها دانلود گردید (اسامی lncRNAها از پایگاه داده OMIM دانلود شد). همه lncRNAهای دخیل در ایجاد و پیشرفت سرطان کلیه استخراج گردید. پس از آن، lncRNAها در گام اول در پایگاه داده Cbioportal و سپس در پایگاه داده lncRNA Disease بررسی و همه اطلاعات مربوط به آن‌ها استخراج شد و میزان تغییرات بیان lncRNAهای کاندید در سرطان کلیه به صورت کمی گزارش گردید. در سایت Cbioportal اسم سرطان وارد شد.

استفاده از روش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی تأیید گردید. کلونی‌های ترانسفورم شده در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth حاوی آمپی‌سیلین در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید یکتا تجهیز آزما طبق دستورالعمل کیت، خالص‌سازی گردید. کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده توسط نانودراپ (ترموساینتیفیک ۲۰۰۰، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۱).

کشت سلول و دست‌ورزی سلول‌ها: رده سلولی ACHN با کد سلولی C206 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری گردید و در فلاسک کشت بافت، حاوی محیط RPMI 1640 (بیواید، ایران) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS، بیواید، ایران) و ۱۰۰ واحد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین در هر ۱ میلی‌لیتر کشت شد. فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۵ درصد CO₂ تا زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد برسند، انکوبه گردید. به منظور انجام ترنسفکشن (انتقال وکتور‌ها به سلول)، سلول‌های ACHN در ۳ خانه از پلیت ۶ خانه‌ای مخصوص کشت شدند. در مجموع، دو گروه سلولی ترنسفکشن گردیدند: ACHN ترنسفکشن شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-buzforin II (گروه تیمار)، سلول ACHN ترنسفکشن شده با پلاسمید خالی (گروه کنترل) و خانه سوم شامل سلول‌هایی بودند که هیچ‌گونه پلاسمید دریافت نکرده بودند (گروه شاهد). سلول‌ها با استفاده از لیوفکتامین ۲۰۰۰ (شرکت ترموفیشر، آمریکا) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، با پلاسمیدهای نامبرده ترانسفکشن شدند. به طور خلاصه، ۱۰۶ × ۰/۳ سلول در خانه‌های پلیت ۶ خانه کشت گردید. پس از ۲۴ ساعت (هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۷۵-۵۰ درصد رسیدند)، مخلوط حجمی حجمی لیوفکتامین ۲۰۰۰ (۷/۵ میلی‌گرم در هر چاهک) و پلاسمید (۲/۵ میلی‌گرم در هر چاهک) در حجم نهایی ۳۰۰ μL از محیط کشت

RPMI (بدون آنتی‌بیوتیک و FBS) به سلول‌ها افزوده گردید. پلیت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد CO₂ به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و سپس FBS به چاهک‌ها اضافه گردید و پلیت کشت مجدد به مدت ۲۴ ساعت در همان شرایط انکوبه شد. محیط کشت حاوی ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۱۲) نئومایسین برای غربالگری سلول‌های ترانسفکشن شده از غیر ترانسفکشن شده اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها انکوبه شدند. نشانگر انتخابی وکتور pcDNA3.1(+) مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین است. در واقع، سلول‌های دریافت‌کننده وکتور زنده می‌مانند و سلول‌هایی که ترانسفکشن نشده باشند، در حضور نئومایسین از بین می‌روند. سرانجام سلول‌های هر گروه با استفاده از ۰/۲۵ درصد آنزیم Trypsin-EDTA (ترموفیشر، آمریکا) جدا گردیدند و در محیط کشت با ۱۰ FBS درصد کشت شدند. استخراج RNA و سنتز cDNA: RNA تام سلولی در هر دو گروه ترنسفکشن شده با وکتور نو ترکیب (گروه تیمار) و وکتور خالی (گروه کنترل)، با استفاده از محلول RNX-Plus (سینا کلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای رندوم هگزامر سنتز شد. به منظور تأیید صحت واکنش ترنسفکشن، واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن buforin II روی cDNA سنتز شده صورت گرفت. محصول PCR حاصل از فعالیت دو پرایمر F و R یک قطعه ۸۷ جفت بازی خواهد بود.

بررسی میزان بیان ژن‌ها: از روش real time RT-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های گروه تیمار (سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-buzforin II) در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی) استفاده گردید. جزئیات پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی استفاده شده

Gene	Primer sequence	Anneling Temperatur	Siz bp
GAPDH	GAPDH-F: 5'- GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC-3'	60	183
	GAPDH-R: 5'- GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC-3'		
EGOT	EGOT-F: 5'- AGATGGTGATGGAAACGAGC-3'	60	107
	EGOT-R: 5'- CCTGTTCATAAGCCCTGATG-3'		
LINC00312	LINC00312-F: 5'- AAGCGAACCAAGCCAATAAG-3'	60	161
	LINC00312-R: 5'- AATGAGGAAATGTACCACCC-3'		
PVT1	PVT1-F: 5'- CCTTGGTGTTCCCTTTTACTGC-3'	60	225
	PVT1-R: 5'- AACATGGTGAAACCCCGTCTCTAC-3'		
buforin II	Bufo-F: 5'- ATGACAAGAAGCAGCAGAGCC-3'	60	66
	Bufo-R: 5'- CTTTCTCAGCAGTCTGTGCACTC-3'		

مقایسه هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد (۱۳). تجزیه و تحلیل آماری: همه آزمون‌های انجام شده به صورت سه بار تکرار بودند و نتایج آزمون آماری توصیفی به شکل میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. برای بررسی وجود داشتن یا نداشتن ارتباط معنادار از آزمون t-test استفاده شد. نمودارها به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism رسم گردید و همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۱۴).

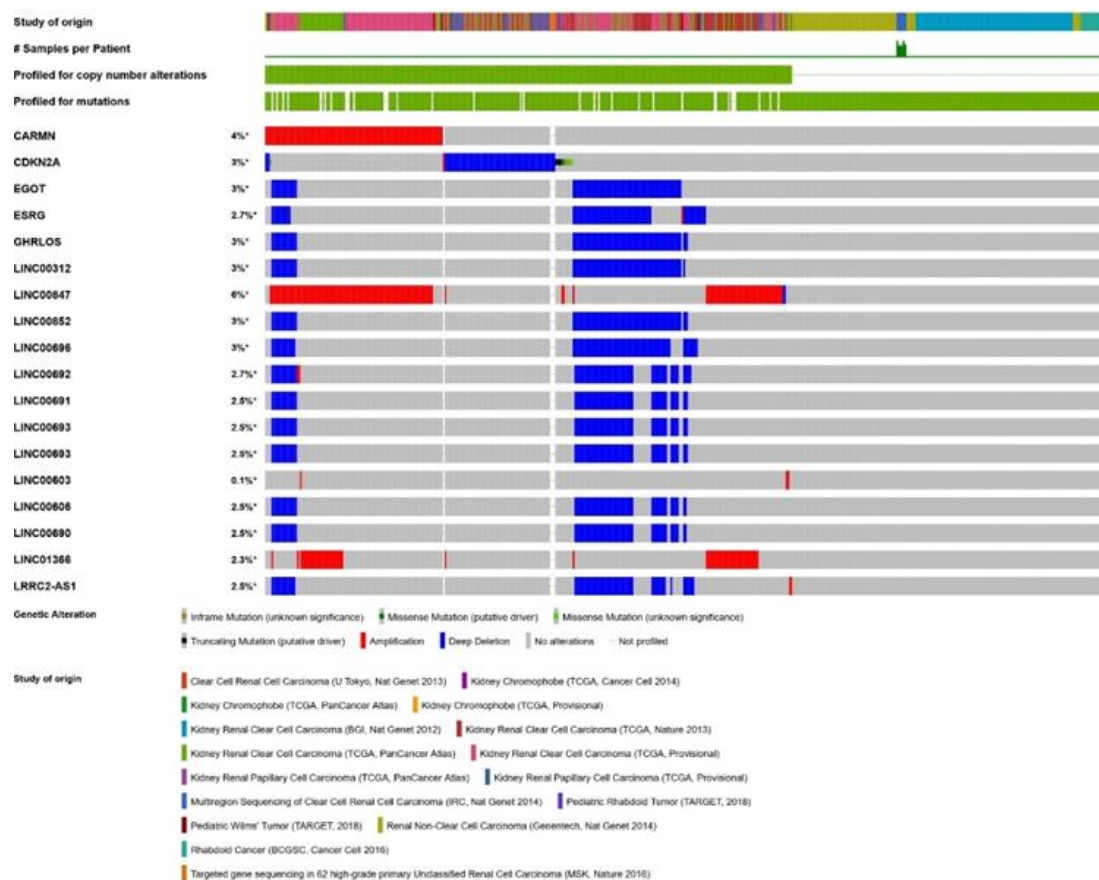
یافته‌های پژوهش

نتایج مربوط به شناسایی ژن‌ها با بیان متغیر: به منظور شناسایی lncRNAهای مهم و دخیل در پیشرفت و توسعه سرطان کلیه از ابزارهای بیوانفورماتیکی از جمله پایگاه‌های داده آنالیز استفاده گردید. همان‌طور که گفته شد، از یک پایگاه داده برای پیش‌بینی differentially expression ژن‌ها استفاده گردید و lncRNAهای سرطان کلیه تعیین شدند. نمادها و نام هر lncRNA از پایگاه داده HUGO Gene Namenclature Committee اخذ گردید. اسامی lncRNA

ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد. cDNA هر گروه در رقت سریال‌های ۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵ و ۱:۳۱۲۵ تهیه گردید. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۳ μ L بود که حاوی ۱ μ L از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر کیت SYBR®Premix Ex Taq™ II (تاکارا، ژاپن)، ۰/۵ μ L از هر دو پرایمرهای F/R و ۵/۴ μ L آب مقطر است. همه واکنش‌ها به صورت تکرار سه‌تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامه دمایی ذیل انجام گردید: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه طول‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در نهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجه سانتی‌گراد به ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱ درجه سانتی‌گراد در ثانیه) رسم شد. برای محاسبه بیان ژن، چرخه‌های آستانه (CT) توسط نرم‌افزار Rotor-Gene Real-time analysis vol.6 رسم گردید. تغییرات نسبی بیان ژن‌ها توسط روش لیواک $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با

LINC00696، LINC00852، LINC00847
LINC00690، LINC00606، LINC00693، LINC00692
و LRRC2-AS1 انتخاب گردیدند. در مرحله بعد، از میان
LncRNAهای انتخاب شده EGOT و LINC00312 با مسیر
های آپیتوز مطالعه شده ارتباط داشتند و انتخاب شدند (شکل
شماره ۱). برای تأیید نتایج مطالعه *in silico*، LncRNA PVT1
به عنوان یک LncRNA اونکوژن مطالعه گردید.

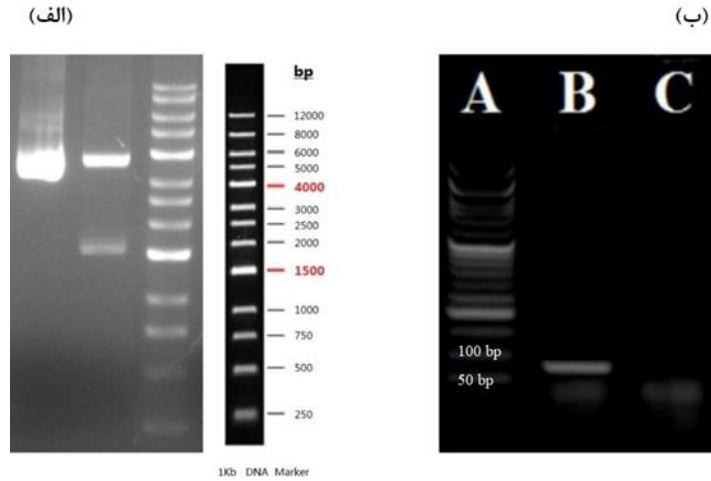
های به دست آمده در پایگاه داده Cbioportal کپی شد و
LncRNAهایی که بالاترین Alternation را داشتند، کاندید
گردیدند. فرمت FASTA هر LncRNA به پایگاه داده
LncDisease داده شد و LncRNAهای دارای پروفایل بیانی
بالاتر انتخاب گردیدند. تعداد ۲۰۰ ژن دخیل در سرطان کلیه
شناسایی شد. بر اساس نتایج اولیه، ۱۵ مورد LncRNA با
پروفایل بیانی بالای ۲/۵ شامل CARMN، CDKN2A،
EGOT، ESRG، GHRLOS، LINC00312



شکل شماره ۱. انتخاب LncRNA در سرطان کلیه. LncRNAهایی که پروفایل بیانی بالای ۲/۵ داشتند، انتخاب شدند.

را تأیید کرد. پس از انتقال پلاسمید نو ترکیب به *E. coli* سویه
TOP10، صحت ورود پلاسمید توسط کشت کلونی‌ها بر
روی آمپی‌سیلین در مرحله نخست و سپس انجام واکنش
PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن buforin II تأیید شد.
حضور باند ۶۶ جفت بازی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی
F و R ژن buforin II مؤید صحت انتقال پلاسمید بود (شکل
شماره ۲. ب).

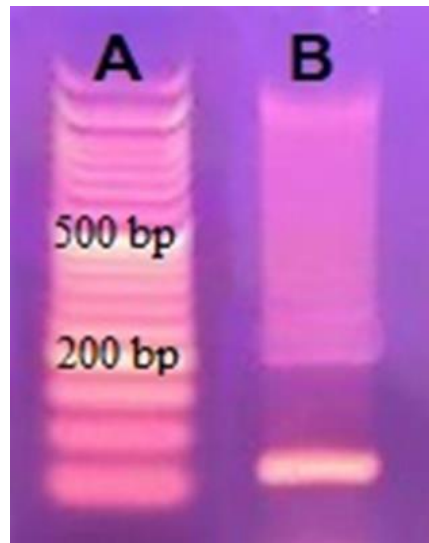
تأیید فرایند کلونینگ و ساخت وکتور نو ترکیب:
صحت سنتز پلاسمیدها توسط شرکت سازنده با استفاده از
توالی‌یابی DNA و هضم آنزیمی (با کمک آنزیم‌های
محدودکننده NdeI-StuI تأیید گردید (شکل شماره ۲.
الف). همان‌طور که در عکس مشخص است، پس از هضم
آنزیمی دو باند ۳۸۵۹ جفت بازی حاوی وکتور و باند ۱۶۱۱
جفت باز حاوی ژن buforin II صحت سنتز وکتور نو ترکیب



شکل شماره ۲. نتایج مربوط به صحت سنتز و ترانسفورم پلاسمید. الف. هضم آنزیمی و کتور pcDNA3.1(+) حاوی ژن buforin II، نتایج حاصل از هضم آنزیمی باند ۳۸۵۹ جفت بازی و باند ۱۶۱۱ جفت باز است. مارکر DNA یک کیلو جفت بازی؛ ب. واکنش PCR بر روی پلاسمید نو ترکیب استخراج شده؛ شماره B. باند مربوط به ژن buforin II (bp 66) بر روی و کتور pcDNA3.1(+)-buforin II؛ شماره C. و کتور خالی با پرایمرهای ژن buforin II و A. مارکر ۵۰ جفت بازی شرکت یکتا تجهیز آزما.

در حالی است که گروه شاهد که هیچ گونه پلاسمیدی را دریافت نکرده بودند، پس از افزودن آنتی بیوتیک نئومايسين به محیط کشت آن‌ها از بین رفتند. از سوی دیگر، انجام واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن buforin II روی سلول‌های لیپوفکت شده سبب تشکیل باند ۶۶ جفت بازی گردید و صحت واکنش لیپوفکشن تأیید شد (شکل شماره ۳).

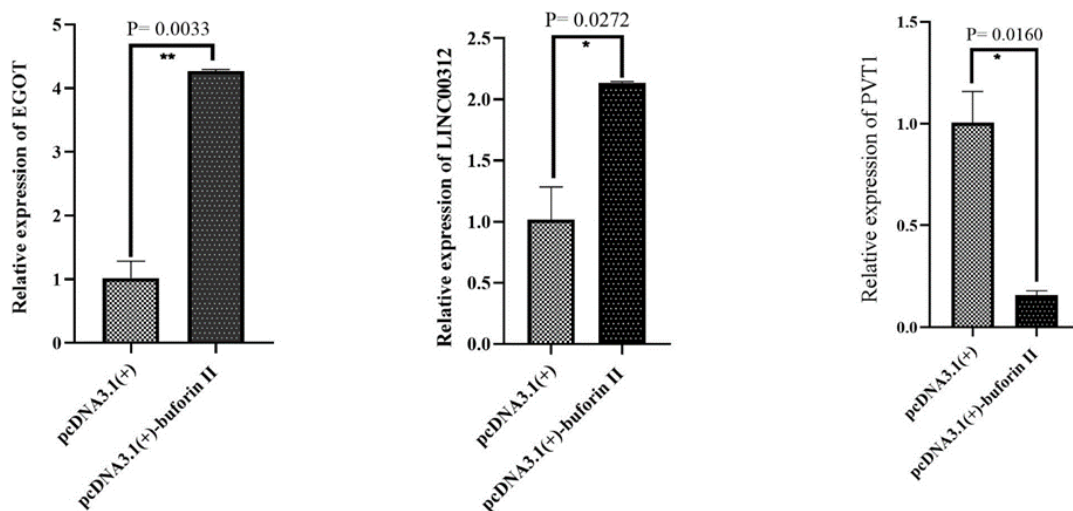
تأیید صحت لیپوفکشن: در شرایط یکسان سلول‌های ACHN به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول پلاسمیدهای نو ترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II را دریافت کردند (گروه تیمار) و گروه دوم پلاسمید خالی را دریافت نمود (گروه کنترل). گروه سوم نیز به عنوان گروه شاهد هیچ پلاسمیدی دریافت نکرد. مقاومت و زنده ماندن سلول‌های ترانسفکت شده با وکتورها در برابر آنتی بیوتیک نئومايسين، حضور و کتورها در سلول‌های مقاوم شده را تأیید می‌کند، این



شکل شماره ۳. محصول RT-PCR. محصولات تکثیر یافته بر cDNA سلول‌های ACHN ترانسفکت شده با وکتورهای نو ترکیب به منظور ارزیابی بیان ژن buforin II بر روی ژل آگارز ۱ درصد؛ شماره B. باند مربوط به buforin II (bp 66) بر روی cDNA سلول ACHN- buforin II و A. مارکر ۵۰ جفت بازی (شرکت اسمو بايو).

تیمار)، میزان بیان lncRNA های EGOT و LINC00312 افزایش معنی داری را نسبت به سلول‌های گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.05$). از سوی دیگر، بیان PVT1 در سلول‌های دست‌ورزی شده نسبت به سلول‌های کنترل، به شکل معنی داری نشان از کاهش بیان داشت ($P < 0.05$) (شکل شماره ۴). این نتایج مؤید آن است که lncRNA های کاندید شده در این مطالعه با آزمون‌های آزمایشگاهی تأیید گردید و بیان ژن buforin II باعث تغییر بیان ژن‌های مورد مطالعه شده است.

نتایج تغییر بیان ژن‌ها: بر اساس نتایج مطالعات *in silico* در این پژوهش، دو lncRNA به نام‌های EGOT و LINC00312 برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند. علاوه بر این، lncRNA PVT1 نیز برای تأیید نتایج *in silico* آزمایش گردید. ارتباط افزایش یا کاهش بیان ژن‌های بالا در دو گروه سلول تیمار و کنترل به روش real time RT-PCR بررسی شد و نتایج زیر به دست آمد. در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pcDNA3.1(+)-buforin II (گروه



شکل شماره ۴. مقایسه سطح بیان lncRNA های مطالعه شده در رده ACHN. تغییر بیان در گروه ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II در مقایسه با وکتور خالی.

lncRNA PVT1 کاهش معنی داری را در سلول‌های دست‌ورزی شده با وکتور نو ترکیب در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل نشان داد.

لی و همکارانش در سال ۲۰۱۵، به بررسی آثار matrine بر روند القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی انسانی MCF-7 و سازوکارهای مولکولی مرتبط با آن پرداختند و پس از بررسی‌های پروتئینی نتیجه گرفتند که تکثیر سلول‌های MCF-7 به طور قابل ملاحظه‌ای توسط پیتید matrine مهار شد و همچنین سبب القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه MCF-7 می‌شود که به Bax مرتبط است (۱۵).

ژو و همکاران در سال ۲۰۲۲، گزارشی درباره پیتیدهای ضد سرطانی ارائه دادند. این محققان اعلام کردند که به علت ساختار فیزیولوژیکی پیچیده، ریز محیط و موانع

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه که درباره سرطان سلول کلیوی انجام شد، سعی بر این بود تا با بیان پیتید buforin II، تأثیر آن در تغییر بیان lncRNA های انتخابی در رده سلول سرطانی ACHN بررسی گردد. با استفاده از پایگاه‌های داده آنالین، lncRNA های انتخابی شدند. از واکنش real time RT-PCR برای ارزیابی تغییر بیان lncRNA ها تحت تأثیر پیتید buforin II استفاده گردید. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از واکنش real time RT-PCR نشان دهنده تغییر در بیان lncRNA های کاندید شده است، به طوری که lncRNA های EGOT و LINC00312 در سلول‌هایی که تحت دست‌ورزی با وکتور نو ترکیب قرار گرفته بودند، نسبت به گروه کنترل افزایش بیان محسوسی را نشان دادند. از سوی دیگر، بیان

تغییر بیان lncRNAهای رده سلولی ACHN بررسی کردیم و به نتایج مشابهی دست یافتیم. پس از کانید lncRNAها در سرطان کلیه، مطالعات آزمایشگاهی انجام شد. ما پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II (به عنوان گروه تیمار) و همچنین پلاسمید خالی pcDNA3.1 (+) (به عنوان گروه کنترل) را در رده سلولی ACHN ترانسفکت کردیم. پس از اطمینان از واکنش ترانسفکشن و غربالگری سلول‌ها، تغییر بیان lncRNAها بررسی و تأیید شد. همسو با این مورد، پارکر و همکاران مطالعه‌ای را روی پپتید buforin II انجام دادند. در این پژوهش، آثار هدف‌گیری سلولی، نفوذ سلولی و ضد تکثیر buforin II برای کمک به هدف قرار دادن دوز سیتوتوکسیک سایر داروها به سلول‌های سرطانی استفاده گردید. نتایج نشان‌دهنده این مطلب بود که تأثیر سیتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی تخمدان در گروه استفاده‌کننده buforin II بیشتر از گروه کنترل بود (۱۸). همسو با مطالعات پیشین، نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از تغییر بیان lncRNAهای شناسایی شده است. از آنجا که lncRNA PVT1 به عنوان یک انکوژن شناسایی گردیده است و مطالعات عنوان کرده‌اند که PVT1 می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی برای پیش‌بینی بیماران RCC عمل کند (۱۹)، کاهش بیان آن تحت تأثیر پپتید buforin II می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن مسیرهای آپوپتوز سلولی در سلول ACHN تحت مطالعه باشد.

با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل آماری و همچنین مشاهدات میکروسکوپی کشت سلولی می‌توان چنین اعلام کرد که ژن buforin II پس از انجام فرایند لیپوفکشن، درون سلول‌های سرطانی بیان شده و روی سلول و بیان lncRNAهای منتخب تأثیر گذاشته است. بر اساس نتایج آماری این پژوهش، بیان ژن buforin II در سلول‌های سرطان کلیه سبب تغییر بیان معنی‌داری در lncRNAهای PVT1، EGOT و LINC00312 می‌شود و می‌توان این مطلب را عنوان کرد که به تغییر مسیرهای سلول سرطانی و فعال شدن مسیرهای آپوپتوز سلولی منجر می‌گردد. بر اساس نتایج این مطالعه، پپتید buforin II ممکن است آپوپتوز سلولی را در سلول‌های رده

فیزیولوژیکی متعدد، دسترسی داروهای ضدسرطان سنتی به محل تومور به شدت محدود شده است. پپتیدهای نفوذکننده به سلول معمولاً از ۵ تا ۳۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و می‌توانند به عنوان ناقل مولکولی برای تسهیل عبور داروهای درمانی از موانع فیزیولوژیکی استفاده گردند. تا به حال، پپتیدها به طور گسترده در بسیاری از راهبردهای درمان ضدسرطان استفاده شده‌اند و به عنوان یک انتخاب بالقوه عالی برای درمان سرطان عمل می‌کنند؛ با این حال، معایب آن‌ها مانند عدم اختصاصیت سلولی، مدت کوتاه اثر، پایداری ضعیف در داخل بدن، مشکلات سازگاری (به عنوان مثال ایمنی‌زایی)، اثربخشی درمانی ضعیف و تشکیل متابولیت‌های ناخواسته، کاربرد بیشتر آن‌ها را در درمان سرطان محدود کرده است. سازوکارهای جذب سلولی پپتیدها عمدتاً شامل اندوسیتوز و نفوذ مستقیم است؛ اما هنوز این مسئله بسیار بحث‌برانگیز است. راهبرد تحویل داروی مبتنی بر پپتید را نیز می‌توان با طراحی هوشمندانه یا اصلاحات شیمیایی برای توسعه نسل بعدی پپتیدها با قابلیت نفوذ سلولی، پایداری و گزینش‌پذیری بهبود بخشید (۱۶).

وکیلی و همکاران طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۳ اعلام کردند که پپتیدهای ضد میکروبی بخشی از دستگاه ایمنی ذاتی گونه‌های مختلف هستند. علاوه بر مطالعات گسترده درباره کاربرد احتمالی آن‌ها به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی، پپتیدهای ضد میکروبی همچنین برای بهبود زخم، آثار ضدالتهابی و تعدیل‌کننده دستگاه ایمنی تحت بررسی هستند. علاوه بر این، عملکرد و مزایای پپتیدهای ضد میکروبی در طراحی و تولید عوامل ضدسرطان ارزیابی شده است. همسو با این امر، تأثیر پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی یا مشتقات مصنوعی آن‌ها بر سمیت سلولی سلول‌های طبیعی و سرطانی تأیید گردیده است؛ همچنین برخی از پپتیدهای ضد میکروبی (یا مشتقات آن‌ها) به عنوان پپتیدهای نفوذکننده سلول خاص عمل می‌کنند که آن‌ها را برای هدف قرار دادن یک بخش سیتوتوکسیک یا یک حامل دارو به سوی سلول‌های سرطانی مناسب می‌کند (۱۷).

ما نیز در این مطالعه، تأثیر بیان پپتید buforin II را در

سرطانی کلیه (ACHN) فعال کند.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است. بدین وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1402.014 تصویب گردیده و همه مراحل مطالعه درباره رده سلولی سرطانی انجام شده است.

تعارض منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارض ندارد.

کد اخلاق

IR.IAU.SHK.REC.1402.014

References

- Chen Z, Han F, Du Y, Shi H, Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 17;8:70. doi: 10.1038/s41392-023-01332-8.
- Colomer-Lahiguera S, Steimer M, Ellis U, Eicher M, Tompson M, Corbière T, et al. Patient and public involvement in cancer research: A scoping review. *Cancer Med* 2023; 16. doi: 10.1002/cam4.6200.
- Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Res* 2018;7: 1-10. doi: 10.12688/f1000research.13179.1.
- Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Jami MS. Integrative analysis of lncRNAs in kidney cancer to discover a new lncRNA (LINC00847) as a therapeutic target for staphylococcal enterotoxin tst gene. *Cell J* 2020;22:101. doi: 10.22074/cellj.2020.6996.
- Jin L, Quan J, Pan X, He T, Hu J, Li Y, et al. Identification of lncRNA EGOT as a tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2017;16:7072-9. doi: 10.3892/mmr.2017.7470.
- Guo Z, Wang YH, Xu H, Yuan CS, Zhou HH, Huang WH, et al. LncRNA linc00312 suppresses radiotherapy resistance by targeting DNA-PKcs and impairing DNA damage repair in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis* 2021;12:69. doi: 10.1038/s41419-020-03302-2.
- Li M, Wang Y, Cheng L, Niu W, Zhao G, Raju JK, et al. Long non-coding RNAs in renal cell carcinoma: a systematic review and clinical implications. *Oncotarget* 2017;8:48424-35. doi: 10.18632/oncotarget.17053.
- Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol* 2009; 625:190-4. doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.043.
- Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:8245-50. doi: 10.1073/pnas.150518097.
- Lee HS, Park CB, Kim JM, Jang SA, Park IY, Kim MS. Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. *Cancer Lett* 2008; 271:47-55. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.041.
- Safarpour M, Kazemi Z, Doosti E, Doosti A. Cloning tagD gene from helicobacter pylori in PFLAG-CMV-3 eukaryotic vector to generate a DNA vaccine. *JIUMS* 2016; 14:43-50. 10.29252/JMJ.14.4.43.
- Seim I, Jeffery PL, Thomas PB, Walpole CM, Maugham M, Fung JN, et al. Multi-species sequence comparison reveals conservation of ghrelin gene-derived splice variants encoding a truncated ghrelin peptide. *Endocrine* 2016; 52:609-17. doi: 10.1007/s12020-015-0848-7.
- Safarpour-Dehkordi M, Samimi-Dehkordi N, Asgari M, Khademi R, Kabirian-Dehkordi M, Amiri M, et al. Co-expression network analysis for the identification of potential prostate cancer genes and in vitro confirmation of their expression in cell model in the presence of Staphylococcal tsst-1 gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2023; 17:1-6. doi:10.1080/15257770.2023.2249544.
- Safarpour-Dehkordi M, Doosti A, Jami MS. Impacts of the Staphylococcal Enterotoxin H on the Apoptosis and lncRNAs in PC3 and ACHN. *Mol Gen Microbiol Virol* 2020; 35:180-8. doi: 10.3103/S0891416820030076.
- Li H, Li X, Bai M, Suo Y, Zhang G, Cao X. Matrine inhibited proliferation and increased apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:14793.
- Zhou M, Zou X, Cheng K, Zhong S, Su Y, Wu T, et al. The role of cell-penetrating peptides in potential anti-cancer therapy. *Clin Transl Med* 2022;12: e822. doi: 10.1002/ctm2.822.
- Vakili B, Jahanian-Najafabadi A. Application of Antimicrobial Peptides in the Design and Production of Anticancer Agents. *Int J Pept Res Ther* 2023; 20; 29:28.
- Parker JP, Devocelle M, Morgan MP, Marmion CJ. Derivatisation of buforin IIb, a cationic henicosapeptide, to afford its complexation to platinum (ii) resulting in a novel platinum (ii)-buforin IIb conjugate with anti-cancer activity. *Dalton Trans* 2016;45:13038-41. doi: 10.1039/c6dt01510g.
- Li M, Wang Y, Cheng L, Niu W, Zhao G, Raju JK, et al. Long non-coding RNAs in renal cell carcinoma: a systematic review and clinical implications. *Oncotarget* 2017; 7; 8:48424. doi: 10.18632/oncotarget.17053.