Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Maryam Amiri-Farsani [1], Abbas Doosti [2*]

[1] Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Biotechnology 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

A B S T R A C T

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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

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

مریم امیری فارسانی [۱]، عباس دوستی [۲*]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۰۹
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۳/۲۶

نویسنده مسئول:
عباس دوستی
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
Email:
bio.gene84@gmail.com

چکیده

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

مواد و روش‌ها: پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+) حاوی ژن buforin II و پلاسمید خالی pcDNA3.1(+) به روش شوک حرارتی وارد باکتری E.coli سویهٔ 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. درنهایت، واکنش real time RT-PCR به‌منظور بررسی تغییر بیان lncRNAهای EGOT، PVT1 و LINC00312 انجام گردید.

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

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 ازجمله آپتوزیز را فعال کند.

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

استناد: امیری فارسانی مریم، دوستی عباس. بررسی آثار ژن کدکنندهٔ buforin II بر بیان lncRNAهای PVT1، EGOT و LINC00312 در ردهٔ سلولی سرطان کلیه. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۳؛۳۲(۲): ۴۳-۳۲.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

CC BY NC

مقدمه

سرطان یک بیماری ژنتیکی است که درنهایت، زاییدهٔ 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 رتبهٔ اول جهانی را داشته است، درحالی‌که پیش از آن، بیماری‌های قلب و عروق مقام اول را به خود اختصاص می‌داد (۱). سرطان‌ها به علت نبودِ عملکرد صحیح DNA در سلول‌ها پدید می‌آیند و درواقع، علت اصلی آن به‌سبب 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 به‌ترتیب 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 مشخص‌شده است که شیوع این سرطان در جهان در حال افزایش است. بالاترین میزان بروز را می‌توان در کشور های توسعه‌یافته و اغلب اروپای شمالی و شرقی و آمریکای شمالی یافت (۵-۳). در ایالات‌متحده، 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 شایع‌تر 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 به‌صورت نامتعادل صورت می‌گیرد. شواهد نشان داده‌اند که بخش چشم‌گیری از عامل‌های مستعدکننده به سرطان را نمی‌توان به تغییر در توالی‌های کدکنندهٔ پروتئین نسبت داد. شناسایی شمار بسیاری از lncRNAها در انسان به پرده‌برداری از جایگاه این مولکول‌ها در آسیب‌شناسی سرطان و نقش آن‌ها به‌عنوان اجزای مهم در تومورزایی، کمک شایانی کرده است. lncRNA رونوشت انتوژنی گرانول ائوزینوفیل (EGOT) در p26.13 قرار دارد. مطالعات نشان داده است که EGOT در پاسخ به سیگنال‌های استرس القا می‌شود و به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ مثبت مسیرهای NF-kB و PI3K/AKT عمل می‌کند (۵). lncRNA LINC00312 که به نام NAG7 نیز نامیده می‌شود، به‌عنوان یک ژن جدید سرکوبگر تومور در انواع مختلف سرطان، شناسایی‌شده است (۶). PVT1 به‌عنوان یک انکوژن شناسایی شده است و همچنین در متاستاز RCC افزایش بیان دارد (۷).

علی‌رغم پیشنهادها و درمان‌های اخیر به‌منظور 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 فناوری های جدید وجود دارد. بیشتر پپتیدهای ضدسرطانی به‌طور انتخابی سلول‌های سرطانی را می‌کشند، به این صورت که با اختلال در غشای سلول یا نفوذ و تورم در میتوکندری سلول، سبب مرگ سلول سرطانی می‌شوند. اعتقاد بر این است که با جاذبهٔ الکترواستاتیکی میان اجزای غشای (با بار منفی) سلول های سرطانی و پپتیدهای ضدسرطان کاتیونی، فرایند مرگ سلولی کلید می‌خورد (۸). buforin II یک پپتید ضدمیکروبی قوی با ۲۱ آمینواسید است که در یک محیط آب‌گریز، یک ساختار آمفی‌پاتیک متشکل از یک ناحیهٔ سیم‌پیچ تصادفی ترمینال N، یک ناحیهٔ مارپیچ، یک لولا و یک منطقهٔ آلفا هلیکس در C ترمینال تشکیل می‌دهد (۹) و به‌طور 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 میتوکندری را القا می‌نماید (۱۰).

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

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با کد اخلاق

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

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

مطالعات in silico: به‌منظور شناسایی پروفایل بیانی ژن‌های دخیل در پیشرفت و پاتوژنزیس سرطان کلیه، از پایگاه های دادهٔ آنلاین استفاده شد. برای این هدف، با استفاده از پایگاه دادهٔ OMIM (omim.org) داده‌های سرطان کلیه دانلود گردید. OMIM یک پایگاه داده برای ژن‌های انسانی و اختلالات ژنتیکی است و اطلاعات همهٔ آنالیزهای کلینیکی معتبر در این سایت ادغام شده‌اند؛ به‌عنوان‌مثال، پس از جستجوی واژهٔ 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 به‌دست‌آمده از مرحلهٔ پیش در سایت enrichr جستجو و عملکرد ژن‌ها بررسی گردید. ژن‌های دخیل در پیشرفت و پاتوژنزیس سرطان کلیه کاندید شدند؛ سپس از پایگاه دادهٔ 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 lncRNA، biomart انتخاب شد و سپس گزینهٔ Gene انتخاب گردید. در این قسمت، با IDهای مختلف فیلتر صورت گرفت؛ ازجمله: Locus group = non-coding و Locus type = lncRNA. درنهایت، در بخش OMIM ID اسامی lncRNAهای مدنظر نوشته شد و گزینهٔ GO انتخاب و نام استاندارد ژن‌ها دانلود گردید (اسامی lncRNAها از پایگاه داده OMIM دانلود شد). همهٔ lncRNA های دخیل در ایجاد و پیشرفت سرطان کلیه استخراج گردید. پس از آن، lncRNAها در گام اول در پایگاه دادهٔ cbioportal و سپس در پایگاه دادهٔ lncRNA Disease بررسی و همهٔ اطلاعات مربوط به آن‌ها استخراج شد و میزان تغییرات بیان lncRNAهای کاندید در سرطان کلیه به‌صورت کمی گزارش گردید. در سایت cbioportal اسم سرطان وارد شد. باید توجه داشت همهٔ تیک‌ها علامت بخورند و سپس Quary BY Gene انتخاب گردید و نام ژن نوشته و گزینهٔ Qyary انتخاب شد. بدین ترتیب اسامی lncRNAهای به‌دست‌آمده 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 نوترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II و پلاسمید دست‌نخورده (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 ناحیهٔ 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 سویهٔ 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 به‌کار رفت. سلول ردهٔ 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 وکتور نوترکیب: باکتری E. coli سویهٔ 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 درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) انکوبه شد. پلاسمید نوترکیب نامبرده و پلاسمید خالی با استفاده از روش کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) و شوک حرارتی (۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۹۰ ثانیه) به درون سلول‌های باکتریایی ترانسفورم گردید. کلونی‌های ترانسفورم‌شده در محیط کشت LB آگار، حاوی آمپی‌سیلین (۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) رشد کردند و انتخاب شدند. صحت انجام ترانسفورماسیون با

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

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

کشت سلول و دست‌ورزی سلول‌ها: ردهٔ سلولی ACHN با کد سلولی C206 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری گردید و در فلاسک کشت بافت، حاوی محیط RPMI 1640 (بیوایده، ایران) غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS، بیو ایده، ایران) و ۱۰۰ واحد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین در هر ۱ میلی‌لیتر کشت شد. فلاسک در انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد و در فشار ۵ درصد CO2 تا زمانی که سلول‌ها به تراکم ۷۰–۸۰ درصد برسند، انکوبه گردید. به‌منظور انجام ترنسفکشن (انتقال وکتور ها به سلول)، سلول‌های ACHN در ۳ خانه از پلیت ۶ خانه‌ای مخصوص کشت شدند. درمجموع، دو گروه سلولی ترنسفکشن گردیدند: ACHN ترنسفکت‌شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-buforin II (گروه تیمار)، سلول ACHN ترنسفکت‌شده با پلاسمید خالی (گروه کنترل) و خانهٔ سوم شامل سلول‌هایی بودند که هیچ‌گونه پلاسمید دریافت نکرده بودند (گروه شاهد). سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (شرکت ترموفیشر، آمریکا) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، با پلاسمیدهای نامبرده ترانسفکت شدند. به‌طور خلاصه،۱۰۶ × ۰/۳ سلول در خانه‌های پلیت ۶ خانه کشت گردید. پس از ۲۴ ساعت (هنگامی‌که سلول‌ها به تراکم ۷۵–۵۰ درصد رسیدند)، مخلوط حجمی حجمی لیپوفتکتامین ۲۰۰۰ (۷/۵ میلی‌گرم در هر چاهک) و پلاسمید (۲/۵ میلی گرم در هر چاهک) در حجم نهایی 300 µL از محیط کشت RPMI (بدون آنتی‌بیوتیک و FBS) به سلول‌ها افزوده گردید. پلیت کشت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با فشار ۵ درصد CO2 به مدت ۴ ساعت انکوبه شد و سپس FBS به چاهک ها 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 ترانسفکت‌شده از غیر ترانسفکت‌شده اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت سلول‌ها انکوبه شدند. نشانگر انتخابی وکتور pcDNA3.1(+) مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین است. درواقع، سلول‌های دریافت‌کنندهٔ وکتور زنده می‌مانند و سلول‌هایی که ترانسفکت 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 10 FBS درصد کشت شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: RNA تام سلولی در هر دو گروه ترنسفکت‌شده با وکتور نوترکیب (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. به‌منظور تأیید صحت واکنش ترنسفکشن، واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن buforin II روی cDNA سنتزشده صورت گرفت. محصول PCR حاصل از فعالیت دو پرایمر F و R یک قطعهٔ ۸۷ جفت بازی خواهد بود.

بررسی میزان بیان ژن‌ها: از روش real time RT-PCR برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های گروه تیمار (سلول های ترانسفورم‌شده با پلاسمید pcDNA3.1(+)-buforin II) در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های ترانسفورم‌شده با وکتور خالی) استفاده گردید. جزئیات پرایمرهای استفاده‌شده در جدول شمارهٔ ۱ ذکرشده است.

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی استفاده‌شده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

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

ژن GAPDH به‌عنوان 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 واکنش13 µL بود که حاوی 1 µL از هر cDNA نمونه (۵۰ نانوگرم)، ۶/۵ میکرولیتر کیت SYBR®Premix Ex TaqTM II (تاکارا، ژاپن)، ۰/۵ µL از هر دو پرایمرهای F/R و 5/4 µL آب مقطر است. همهٔ واکنش‌ها به‌صورت تکرار سه‌تایی انجام شدند. برای هر واکنش q-PCR برنامهٔ دمایی ذیل انجام گردید: ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی گراد و ۳۰ ثانیه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد. درنهایت، منحنی ذوب با افزایش دما از ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد (۱ درجهٔ سانتی‌گراد در ثانیه) رسم شد. برای محاسبهٔ 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 مقایسهٔ هر ژن هدف و ژن مرجع ارزیابی شد (۱۳).

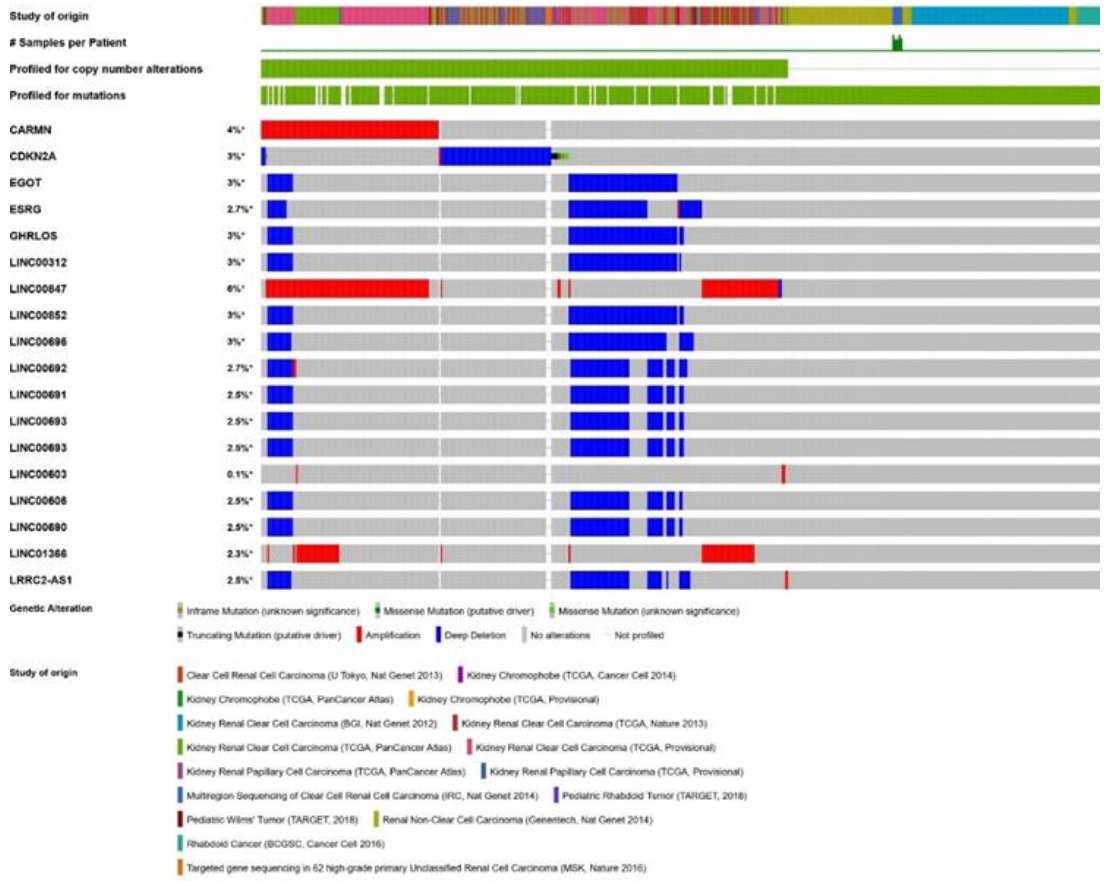
تجزیه‌وتحلیل آماری: همهٔ آزمون‌های انجام‌شده به‌صورت سه بار تکرار بودند و نتایج آزمون آماری توصیفی به شکل میانگین±انحراف معیار ارائه گردید. برای بررسی وجود داشتن یا نداشتن ارتباط معنادار از آزمون t-test استفاده شد. نمودارها به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism رسم گردید و همهٔ داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۱۴).

یافته‌های پژوهش

نتایج مربوط به شناسایی ژن‌ها با بیان متغیر: به‌منظور شناسایی lncRNAهای مهم و دخیل در پیشرفت و توسعهٔ سرطان کلیه از ابزارهای بیوانفورماتیکی ازجمله پایگاه‌های دادهٔ آنلاین استفاده گردید. همان‌طور که گفته شد، از یک پایگاه داده برای پیش‌بینی differentially expression ژن‌ها استفاده گردید و lncRNAهای سرطان کلیه تعیین شدند. نماد ها و نام هر lncRNA از پایگاه دادهٔ HUGO Gene Namenclature Committee اخذ گردید. اسامی lncRNA

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

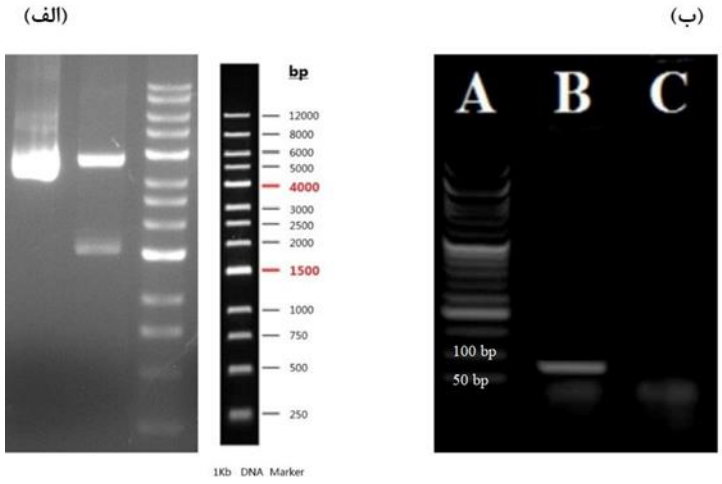
های به‌دست‌آمده در پایگاه دادهٔ Cbioportal کپی شد و lncRNAهایی که بالاترین Alternation را داشتند، کاندید گردیدند. فرمت FASTA هر lncRNA به پایگاه دادهٔ LncDisease داده شد و lncRNAهای دارای پروفایل بیانی بالاتر انتخاب گردیدند. تعداد ۲۰۰ ژن دخیل در سرطان کلیه شناسایی شد. بر اساس نتایج اولیه، ۱۵ مورد lncRNA با پروفایل بیانی بالای ۲/۵ شامل CARMN، CDKN2A، EGOT، ESRG، GHRLOS، LINC00312، LINC00847، LINC00852، LINC00696، LINC00692، LINC00693، LINC00606، LINC00690 و LRRC2-AS1 انتخاب گردیدند. در مرحلهٔ بعد، از میان lncRNAهای انتخاب‌شده EGOT و LINC00312 با مسیر های آپوپتوز مطالعه‌شده ارتباط داشتند و انتخاب شدند (شکل شمارهٔ ۱). برای تأیید نتایج مطالعهٔ in silico، lncRNA PVT1 به‌عنوان یک lncRNA اونکوژن مطالعه گردید.



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

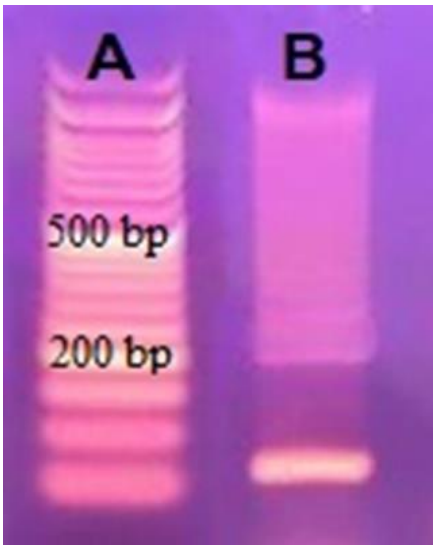
تأیید فرایند کلونینگ و ساخت وکتور نوترکیب: صحت سنتز پلاسمیدها توسط شرکت سازنده با استفاده از توالی‌یابی DNA و هضم آنزیمی (با کمک آنزیم‌های محدودکنندهٔ NdeI-StuI) تأیید گردید (شکل شمارهٔ ۲. الف). همان‌طور که در عکس مشخص است، پس از هضم آنزیمی دو باند ۳۸۵۹ جفت بازی حاوی وکتور و باند ۱۶۱۱ جفت باز حاوی ژن buforin II صحت سنتز وکتور نوترکیب را تأیید کرد. پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به E. coli سویهٔ TOP10، صحت ورود پلاسمید توسط کشت کلونی‌ها بر روی آمپی‌سیلین در مرحلهٔ 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 شمارهٔ ۲. ب).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]



شکل شماره ۲. نتایج مربوط به صحت سنتز و ترانسفورم پلاسمید. الف. هضم آنزیمی وکتور 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 نوترکیب استخراج‌شده؛ شمارهٔ B. باند مربوط به ژن buforin II (bp 66) بر روی وکتور pcDNA3.1(+)-buforin II؛ شمارهٔ C. وکتور خالی با پرایمرهای ژن buforin II و A. مارکر ۵۰ جفت بازی شرکت یکتا تجهیز آزما.

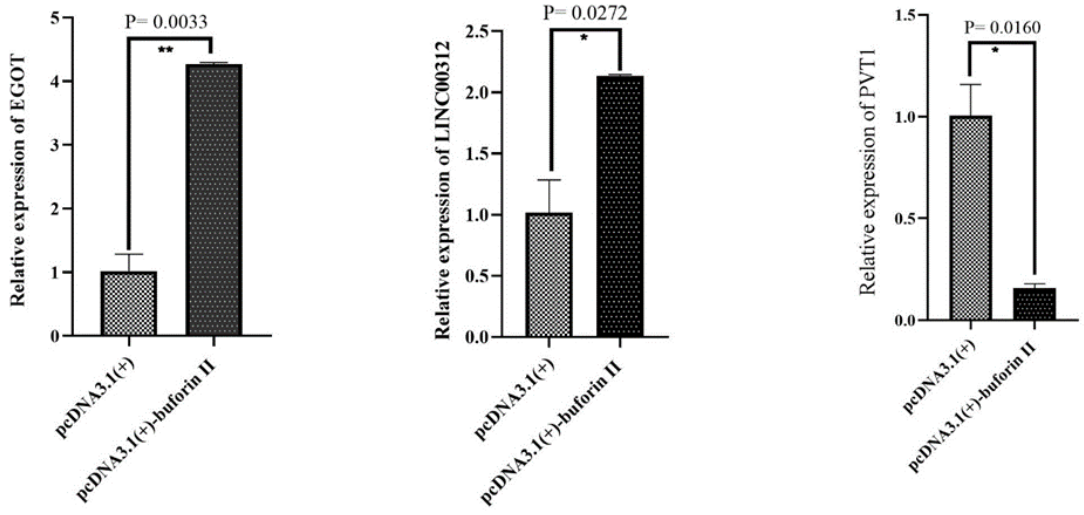
تأیید صحت لیپوفکشن: در شرایط یکسان سلول‌های ACHN به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول پلاسمیدهای نوترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II را دریافت کردند (گروه تیمار) و گروه دوم پلاسمید خالی را دریافت نمود (گروه کنترل). گروه سوم نیز به‌عنوان گروه شاهد هیچ پلاسمیدی دریافت نکرد. مقاومت و زنده ماندن سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتورها در برابر آنتی‌بیوتیک نئومایسین، حضور وکتورها در سلول‌های مقاوم‌شده را تأیید می‌کند، این در حالی است که گروه شاهد که هیچ‌گونه پلاسمیدی را دریافت نکرده بودند، پس از افزودن آنتی‌بیوتیک نئومایسین به محیط کشت آن‌ها از بین رفتند. از سوی دیگر، انجام واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن buforin II روی سلول‌های لیپوفکت‌شده سبب تشکیل باند ۶۶ جفت بازی گردید و صحت واکنش لیپوفکشن تأیید شد (شکل شمارهٔ ۳).



شکل شماره ۳. محصول RT-PCR. محصولات تکثیریافته بر cDNA سلول‌های ACHN ترانسفکت‌شده با وکتورهای نوترکیب به‌منظور ارزیابی بیان ژن buforin II بر روی ژل آگارز ۱ درصد؛ شمارهٔ B. باند مربوط به buforin II (bp 66) بر روی cDNA سلول ACHN- pcDNA3.1(+)-buforin II و A مارکر ۵۰ جفت بازی (شرکت اسمو بایو).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

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 به‌دست آمد. در سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور pcDNA3.1(+)-buforin II (گروه تیمار)، میزان بیان lncRNAهای EGOT و LINC00312 افزایش معنی‌داری را نسبت به سلول‌های گروه کنترل نشان دادند ($P<0.05$). از سوی دیگر، بیان PVT1 در سلول‌های دست‌ورزی‌شده نسبت به سلول‌های کنترل، به شکل معنی داری نشان از کاهش بیان داشت ($P<0.05$) (شکل شمارهٔ ۴). این نتایج مؤید آن است که lncRNAهای کاندیدشده در این مطالعه با آزمون‌های آزمایشگاهی تأیید گردید و بیان ژن buforin II باعث تغییر بیان ژن‌های موردمطالعه شده است.



شکل شماره ٤. مقایسهٔ سطح بیان lncRNAهای مطالعه‌شده در ردهٔ ACHN. تغییر بیان در گروه ترانسفکت‌شده با وکتور نوترکیب pcDNA3.1(+)-buforin II در مقایسه با وکتور خالی.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که دربارهٔ سرطان سلول کلیوی انجام شد، سعی بر این بود تا با بیان پپتید buforin II، تأثیر آن در تغییر بیان lncRNAهای انتخابی در ردهٔ سلول سرطانی ACHN بررسی گردد. با استفاده از پایگاه‌های دادهٔ آنلاین، lncRNA-هایی انتخاب شدند. از واکنش real time RT-PCR برای ارزیابی تغییر بیان lncRNAها تحت تأثیر پپتید buforin II استفاده گردید. تجزیه‌وتحلیل نتایج حاصل از واکنش real time RT-PCR نشان‌دهندهٔ تغییر در بیان lncRNAهای کاندیدشده است، به‌طوری‌که lncRNAهای EGOT و LINC00312 در سلول‌هایی که تحت دست‌ورزی با وکتور نوترکیب قرار گرفته بودند، نسبت به گروه کنترل افزایش بیان محسوسی را نشان دادند. از سوی دیگر، بیان lncRNA PVT1 کاهش معنی‌داری را در سلول-های دست ورزی‌شده با وکتور نوترکیب 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 به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای توسط پپتید 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 دربارهٔ پپتیدهای ضدسرطانی ارائه دادند. این محققان اعلام کردند که به علت ساختار فیزیولوژیکی پیچیده، ریزمحیط و موانع

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

فیزیولوژیکی متعدد، دسترسی داروهای ضدسرطان سنتی به محل تومور به‌شدت محدودشده است. پپتیدهای نفوذکننده به سلول معمولاً از ۵ تا ۳۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و می‌توانند به‌عنوان ناقل مولکولی برای تسهیل عبور داروهای درمانی از موانع فیزیولوژیکی استفاده گردند. تابه‌حال، پپتیدها به‌طور گسترده در بسیاری از راهبردهای درمان ضدسرطان استفاده شده‌اند و به‌عنوان یک انتخاب بالقوهٔ عالی برای درمان سرطان عمل می‌کنند؛ بااین‌حال، معایب آن‌ها مانند عدم اختصاصیت سلولی، مدت کوتاه اثر، پایداری ضعیف در داخل بدن، مشکلات سازگاری (به‌عنوان‌مثال 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 توسعهٔ نسل بعدی پپتید ها با قابلیت نفوذ سلولی، پایداری و گزینش‌پذیری بهبود بخشید (۱۶).

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

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

با توجه به نتایج تجزیه‌وتحلیل 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 lncRNA های 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 ردهٔ

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

سرطانی کلیه (ACHN) فعال کند.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است. بدین‌وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد صمیمانه تشکر و قدردانی می شود. این پروژه در کمیتهٔ اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شناسهٔ IR.IAU.SHK.REC.1402.014 تصویب گردیده و همهٔ مراحل مطالعه دربارهٔ ردهٔ سلولی سرطانی انجام‌شده است.

تعارض منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارض ندارد.

کد اخلاق

IR.IAU.SHK.REC.1402.014.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. Eur J Pharmacol 2009; 625:190-4. doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.043.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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 Patho 2015; 8:14793.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-10-10]