

## بررسی ارتباط بین تغییرات بیان LncRNA THRIL کنترل‌کننده مسیر TNF- $\alpha$ در رده سلولی گلیوبلاستوما تحت تیمار با تموزولامید

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۸ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۱۵ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۳۰

**زمینه و هدف:** گلیوما، شایع‌ترین و کشنده‌ترین تومور بدخیم مغزی است. LncRNA THRIL، از نوع آنتی سنس و واسطه مهم مسیر سیگنالی NF-KB، که در بافت‌ها از جمله سیستم عصبی مرکزی بیان می‌گردد. بخش عمده فرآورده بیان ژن را LncRNA تشکیل می‌دهد. هدف مطالعه، بررسی تغییرات میزان بیان LncRNA THRIL در آدنوکارسینومای گلیوبلاستوما، رده سلولی T98G تحت تیمار با داروی شیمی‌درمانی تموزولامید بود.

**روش بررسی:** مطالعه کنونی از نوع مورد-شاهدی از فروردین تا شهریور ۱۳۹۶ در مرکز علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شده است. رده سلولی T98G در غلظت‌های متفاوت داروی تموزولامید (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$ ) و در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تیمار شده، به ترتیب استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. سپس بیان ژن LncRNA THRIL توسط Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج توسط روش کمیت‌سنجی نسبی و روش لیواک (Livak method) آنالیز گردید.

**یافته‌ها:** بیان ژن THRIL در زمان ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  ( $P < 0/001$ ) کاهش معنادار مشاهده گردید. زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  ( $P < 0/001$ ) به استثنای غلظت ۲۵ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  ( $P < 0/001$ ) افزایش معنادار مشاهده گردید. زمان ۷۲ ساعت در غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  ( $P < 0/001$ ) افزایش معنادار داشته است و در مقابل، غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  ( $P < 0/001$ ) نشان‌دهنده کاهش بیان ژن THRIL بوده‌اند.

**نتیجه‌گیری:** در نتیجه، تغییرات بیان ژن THRIL پس از تیمار، به زمان و غلظت دارو وابسته است و در غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  و زمان ۴۸ ساعت بالاترین تاثیر بر سلول با توجه به بیان ژن داشته است.

**کلمات کلیدی:** LncRNA THRIL، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، TNF- $\alpha$ ، T98G.

لیلا حسینی

گلناز اسعدی تهرانی

سینامیرزا احمدی\*

گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران.

\* نویسنده مسئول: زنجان، خیابان معلم، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک مولکولی.  
کدپستی: ۴۵۱۳۹۶۶۵۳ تلفن: ۰۲۴-۳۳۴۲۱۰۳۰  
E-mail: sinacanmir@yahoo.com

### مقدمه

lncRNAها که تحت عنوان LincRNA یا LncRNA نامگذاری می‌شوند، بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید تا کمتر از ۱۰۰ کیلو باز تعریف می‌شوند.<sup>۱</sup> بیش از نیمی از تمام LncRNAها در سلول‌های سیستم عصبی مرکزی بیان می‌شوند و بیان تنظیم‌شده آن‌ها، در تکامل و عملکرد سیستم عصبی با اهمیت است.<sup>۲</sup> LncRNAها نقش مهمی در برنامه‌های پیشرفت و تمایز عصبی بازی می‌کنند، بنابراین جای تعجب ندارد که LncRNA در مغز سالمندان و اختلالات سیستم عصبی مرکزی دخیل باشند.<sup>۳</sup>

تومورهای مغز، ۸۵ تا ۹۰٪ از تومورهای اصلی سیستم عصبی مرکزی را تشکیل می‌دهند.<sup>۱</sup> گلیوما، شایع‌ترین و کشنده‌ترین تومور مغزی اولیه در سیستم عصبی مرکزی است<sup>۲</sup> که در حدود ۳۰٪ از تومورهای مغز و سیستم عصبی مرکزی و ۸۰٪ تومورهای بدخیم مغز را تشکیل می‌دهند.<sup>۳</sup> در سلول‌های جانوری، بخش عمده‌ای از فرآورده‌های بیان ژن را rRNA غیر کدکننده پروتئین یا ncRNA تشکیل می‌دهند. این نوع

فعال‌کننده NF-KB می‌شود. در حالت عادی و نرمال IRAK4، توسط فراخوانی IRAK1 باعث فعال‌سازی سیگنال پایین دست TLR (مسیر NF-KB) می‌شود و مقاومت شیمیایی را میانجی‌گری می‌کند. مسیر دوم، IRAK2 دارای عملکرد غیرکاتالیکی است و در پایین دست IRAK4 و IRAK1 قرار دارد و می‌تواند پروتیین آداپتور FADD را فعال و یک آبشار سیگنال پایین دست را آغاز کند و در پی آن کاسپازها پی‌درپی فعال شده و در نهایت، القای آپوپتوز صورت گیرد. احتمال دارد که IRAK4-IRAK1-IRAK2-FADD به یکدیگر وابسته باشند و در مسیر درگیر در ایجاد حساسیت شیمیایی سلول‌های گلیوما نسبت به تموزولامید دخیل باشند.<sup>۱۵</sup> حضور IRAK4 در تعیین حساسیت شیمیایی سلول‌های گلیوما نسبت به داروی شیمی‌درمانی تموزولامید، از طریق توانایی آن برای مهار سیگنال TLR و مسیر NF-KB لازم و ضروری است (شکل ۱).

انتهای ۵ ژن TNF- $\alpha$ ، دارای توالی‌های افزایشنده kb می‌باشد و در پروموتور ژن TNF- $\alpha$  چندین جایگاه اتصال برای فاکتور رونویسی NF-KB (NF-KB فاکتوری رونویسی است که باعث افزایش رونویسی از ژن TNF- $\alpha$  می‌شود) وجود دارد، به‌نظر می‌رسد بیان آن وابسته به NF-KB باشد. TNF- $\alpha$  از طریق فعال کردن NF-KB، باعث بیان خود نیز شده، زیرا با فعال شدن NF-KB و انتقال هسته‌ای بیان TNF- $\alpha$  نیز صورت می‌گیرد و دوباره TNF- $\alpha$  تولید می‌شود. عملکردهای دوگانه ژن THRIL در هموستازی و فعال‌سازی پاسخ‌های التهابی نشان می‌دهد که LncRNAها ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های التهاب خودبه‌خودی منفی، مضر باشند. خاموش‌سازی ژن THRIL یا hnRNP L، باعث کاهش اتصال به پروموتور TNF- $\alpha$  و در نتیجه کاهش بیان TNF- $\alpha$  می‌شود. همچنین LncRNA THRIL به‌طور مستقیمی نیز می‌تواند به پروموتور TNF- $\alpha$  متصل شود.<sup>۱۶-۱۸</sup> TNF- $\alpha$  پس از بیان، می‌تواند به گیرنده نوع ۱ (دارای دمین مرگ) متصل شود و باعث شروع مسیر سیگنالی آپوپتوز، توسط کاسپازها یا پاسخ‌های التهابی و تکثیر سلولی (NF-KB و API) شود. فاکتور رونویسی NF-KB، یکی از مهمترین مسیرهای دارای عمل سریع و اولین عامل پاسخگو به محرک‌های سلولی مضر می‌باشد.<sup>۱۹-۲۱</sup>

تموزولامید (TMZ) یک داروی ضد تومور آلکیل‌کننده و متعلق به یک کلاس ضد تومور ایمیدازوترازینونس است. تموزولامید، فعالیت ضد انعقادی و سیتوتوکسیک در رده سلولی و سلول‌های

LncRNA THRIL دارای موقعیت ۱۲۴۰۳۱ و دارای یک اگزون، یک LncRNA آنتی‌سنس است. همچنین به نام‌های Linc1992، BRI3BP-AS1 و TCONS-00020260 شناخته می‌شود و به‌طور تقریبی ۲ kb طول دارد. ژن THRIL، در رشته معکوس ژن BRI3BP قرار دارد و اثر تنظیمی Cis بر روی این ژن اعمال می‌کند، حدود ۴۵۰ bp از ژن THRIL با ۳ UTR از ژن BRI3BP همپوشانی دارد. خاموشی ژن THRIL، باعث کاهش ۵۰ درصدی بیان ژن BRI3BP می‌شود، اما بر بیان سایر ژن‌ها تاثیری ندارد.<sup>۲۰-۲۱</sup> LncRNA THRIL، در بسیاری از بافت‌های انسانی بیان می‌شود و برای القای بیان ژن TNF- $\alpha$  مورد نیاز است. ژن THRIL بیان ژن TNF- $\alpha$  را از طریق اتصال به hnRNP L (یک پروتیین دخیل در پاسخ‌های استرسی) توسط یک فیدبک منفی تنظیم می‌کند. ابتدا یک کمپلکس Linc1992-hnRNP L (RNP) را تشکیل داده و رونویسی از ژن TNF- $\alpha$  را، به‌وسیله اتصال به پروموتور آن تنظیم کرده و در نهایت ژن TNF- $\alpha$  بیان می‌شود. زمانی که بیان ژن TNF- $\alpha$  افزایش یابد، توسط ایجاد یک فیدبک منفی، مانع عملکرد ژن THRIL شده و بیان آن را کاهش داده و به‌دنبال آن، بیان ژن TNF- $\alpha$  نیز کاهش می‌یابد. رابطه‌ی عکس میان بیان ژن‌های THRIL و TNF- $\alpha$ ، با فاز حاد بیماری کوازاکی (شایع‌ترین علت واسکولیت چند سیستمیک دوران کودکی) و بیماری التهابی کودکان در ارتباط است.<sup>۱۵-۱۱</sup>

زمانی که سلول‌های سرطان مغز (گلیوبلاستوما) تحت تیمار توسط داروی شیمی‌درمانی تموزولامید قرار می‌گیرند، دو مسیر توسط سلول‌های گلیوما آغاز می‌شود. مسیر اول، بیان بسیاری از TLRها در بسیاری از سرطان گزارش شده است.<sup>۱۵</sup> IRAK4 دارای عملکرد Pro-apoptotic به‌واسطه توانایی آن در فعال‌سازی است، پس از اتصال لیگاند به TLR، گیرنده فعال‌شده و پروتیین‌های آداپتور، مانند MYD88 را فراخوانده که این پروتیین نیز به نوبه‌ی خود از طریق دمین مرگش، دمین مرگ سرین ترئونین‌کینازی IRAK4 را فرا خوانده و IRAK1، IRAK4 را که در اتصال رسپتور TNF- $\alpha$  است را فسفریله می‌کند و این کمپلکس IKK (کیناز IKK) را فعال می‌کند. این کمپلکس نیز، IKK متصل NF-KB در سیتوپلاسم را آزاد و سپس توسط پروتئازوم‌ها فسفریله و یوبی‌کویتینه می‌شود. در نهایت NF-KB آزاد شده در سیتوپلاسم که آماده انتقال به هسته است را، مهار می‌کند.<sup>۱۵</sup> IRAK4، باعث ایجاد یک فیدبک منفی برای TLRهای



شکل ۱: تصویری شماتیک از مسیب سیگنالی LncRNA THRIL در سلول‌های گلیوبلاستومای تیمار شده توسط تموزولامید که مسیبهای TLR و TNF-α (NF-κB) را درگیر می‌کند. در نهایت باعث کاهش بیان TNF-α، مهار مسیب NF-κB و مهار مسیب TLR می‌شود.<sup>۱۰</sup>

### روش بررسی

پژوهش کنونی از نوع مورد-شاهدی، از فروردین تا شهریور ۱۳۹۶ در مرکز علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شده است. سلول‌های آدنوکارسینوما گلیوبلاستوما رده‌ی T98G انسانی (NCBI.NO: C651)، از انستیتو پاستور ایران در پاساژ یک و تراکم ۸۰٪ (۲×۱۰<sup>۵</sup> cell/cm<sup>2</sup>) خریداری شدند.

کشت و پاساژ سلولی، شمارش سلولی و تهیه غلظت‌های متفاوت از دارو: ابتدا سلول‌های آدنوکارسینوما گلیوبلاستوما رده T98G، در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM85%) که دارای FBS ۱۵٪ بوده کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ °C حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن، به مدت شش روز کشت داده شده و سه

توموری دارد. اثر سیتوتوکسیکی تموزولامید بر سلول‌های توموری ناشی از آلکیله کردن موقعیت اسیژن شماره شش باز گوانین منجر به تشکیل ترکیب اضافی نامتقارن در DNA و القای آپوپتوز می‌شود. افزون بر اثر مهاری رشد، تموزولامید ایمنی‌زایی را تغییر و پتانسیل متاستاز سلول‌های تومور را کاهش می‌دهد.<sup>۲۲-۲۴</sup>

هدف این پژوهش، بررسی ارتباط بین تغییرات بیان LncRNA THRIL کنترل‌کننده مسیب سیگنالی TNF-α، در رده سلولی گلیوبلاستوما تومورهای مغزی تحت تیمار با غلظت‌های متفاوت ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ μM از داروی شیمی‌درمانی تموزولامید در زمان‌های متفاوت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و مقایسه آن‌ها نسبت زمان، غلظت و نسبت به سلول‌های گلیوبلاستومای تیمار نشده با داروی تموزولامید بوده است.

واکنش‌ها برای حجم  $25 \mu\text{l}$  تنظیم شدند،  $12/5 \mu\text{l}$  سایبرگرین (X1)،  $1 \mu\text{l}$  پرایمر جلو و عقب ( $0/4 \mu\text{M}$ )،  $2 \mu\text{l}$  cDNA،  $8/5 \mu\text{l}$  آب دیونیزه را با هم مخلوط کرده و در برنامه زمانی دناتوراسیون اولیه، در دمای  $95^\circ\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه و قطعات DNA در  $40^\circ\text{C}$  در  $40^\circ\text{C}$  سیکل (دناتوراسیون  $95^\circ\text{C}$  پنج ثانیه، اتصال  $55^\circ\text{C}$ ،  $30^\circ\text{C}$  ثانیه، بسط و گسترش  $72^\circ\text{C}$ ،  $30^\circ\text{C}$  ثانیه) تکثیر یافتند.

بررسی تایید حضور ژن و آنالیز آماری: جهت تایید حضور ژن، از روش محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ استفاده شده و طول قطعات برابر با  $300 \text{ bp}$  مشاهده گردید و در شرکت ژن فن‌آوران در یک جهت مستقیم، تعیین توالی شده و مورد تایید قرار گرفت. پس از واکنش تفاوت Ct ژن هدف به ژن رفرنس، به صورت  $\Delta\text{Ct}$  برای هر نمونه محاسبه شد، سپس برای هر نمونه  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Fold change) به دست آمد. برای بررسی بیان ژن THRIL، توسط روش Real-time PCR، روش لیواک (Livak method) و برنامه (۲۰۰۹) REST استفاده شد.  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

با توجه به مقایسه بیان ژن مرجع در گروه‌های تیمار و شاهد، محاسبه ضریب همبستگی و انحراف معیار که یکسان بودن اعداد  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  و Ratio را نشان داد، حاکی از عدم تاثیرپذیری ژن مرجع از دارو بود. تغییرات بیان ژن THRIL در زمان ۲۴ ساعت: در غلظت  $50 \mu\text{M}$  زمان ۲۴ ساعت، طی آنالیزهای آماری بیان ژن THRIL، در سلول‌های این گروه نسبت به سلول‌های گروه کنترل پس از تیمار با دارو، با توجه به  $P = 0/670$  تغییر نکرده است و افزایش بیان به صورت بی‌معنا مشاهده شد، در غلظت  $25 \mu\text{M}$  و  $100 \mu\text{M}$  از دارو، کاهش بیان ژن به صورت معنادار ( $P < 0/001$ ) مشاهده شد (جدول ۱).

تغییرات بیان ژن THRIL در زمان ۴۸ ساعت: در مدت زمان ۴۸ ساعت و در همه غلظت‌های  $25$ ،  $50$  و  $100 \mu\text{M}$  از داروی تموزولامید، در سلول‌های آدنوکارسینوما T98G، تغییرات بیان به صورت کاهش معنادار ( $P < 0/001$ ) مشاهده شد. در غلظت‌های  $25 \mu\text{M}$  (۰/۹۳۶) و  $100 \mu\text{M}$  (۰/۰۰۲) کاهش بیان و در غلظت  $50 \mu\text{M}$  افزایش بیان مشاهده شد (جدول ۱).

تغییرات بیان ژن THRIL در زمان ۷۲ ساعت: در غلظت  $25 \mu\text{M}$ ،

پاساژ، دو روز یکبار بر سلول‌ها اعمال گردید و بین پاساژها، تعویض محیط کشت انجام شد. سپس سلول‌های پاساژ چهارم، برای مراحل بعدی انتخاب گردید. همچنین میزان دو برابر شدگی جمعیت سلولی رده T98G، برابر با ۲۸ ساعت بوده است. سلول‌ها، تحت شمارش سلولی و رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو قرار گرفتند و تعداد سلول‌ها، برابر با  $3 \times 10^6 \text{ cell/cm}^2$  تعیین شد. سلول‌ها، به دو گروه شاهد (Control) و تیمار (Sample) تقسیم شدند. یک عدد کیسول تموزولامید در DMSO و در غلظت  $105 \mu\text{M}$  (عددی نزدیک غلظت پلاسمای انسان  $100 \mu\text{M}$  است) حل شده و گروه تیمار با غلظت‌های  $25$ ،  $50$  و  $100 \mu\text{M}$  از داروی تموزولامید تهیه شده در حلال DMSO، در سه گروه زمانی  $24$ ،  $48$ ،  $72$  ساعته استفاده شدند. سلول‌های کنترل نیز دارای DMSO (حلال دارو) و همچنین سلول‌هایی فاقد DMSO و دارو بودند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real-time PCR: سلول‌ها پس از گذراندن زمان‌های گفته شده برای بررسی میزان بیان ژن، ابتدا استخراج RNA توسط High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat # 11 858874001) و مطابق با دستورکار کیت انجام شد. با استفاده از کیت (Takara Bio, Otsu, Japan, Cat # RR037Q) و مطابق با دستورکار کیت گفته شده از روی RNA حاصله، cDNA ساخته شد. ترکیبات لازم جهت سنتز با حجم نهایی  $10 \mu\text{l}$ ،  $2 \mu\text{l}$   $1 \times$  Primer script Buffer،  $0/5 \mu\text{l}$  Oligo dT (۲۵ pmol)،  $0/5 \mu\text{l}$  Primer script RT enzyme Mix1،  $0/5 \mu\text{l}$  primer (۵۰ pmol)،  $3/5 \mu\text{l}$  Total RNA،  $3 \mu\text{l}$  RNase free dH2O را با هم مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  و سپس ۱۶-۸ ثانیه در دمای  $85^\circ\text{C}$  در چرخه‌ی RT-PCR قرار گرفتند. با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q real-time PCR cyler (Qiagen, Hilden, Germany) و به کارگیری دستورکار کیت SYBR® (Takara Bio, Otsu, Japan, Cat # RR820Q)، ژن THRIL و GAPDH به عنوان ژن مرجع، به صورت سه‌تایی در دستگاه قرار داده و تکثیر گردید.

توالی پرایمر (۴-۵) استفاده شده برای THRIL، به صورت پرایمر جلو: GAA ACA GGT GCA CGT TTC AGG و پرایمر عقب: ACA GAT GTA CCC TGG CAA CC و برای GAPDH به صورت پرایمر جلو: TCT TCA CCA CCA TGG AGA AGG CT و پرایمر عقب: CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA بوده است.

جدول ۱: نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز بیان ژن *THRIL* با ژن رفرنس *GAPDH* در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  دارو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط روش لیواک

گروه	انحراف معیار	$\frac{\text{THRIL}}{\text{GAPDH}}$	P
کنترل	۰	۱	۱
غلظت ۲۵ TMZ (۲۴ ساعت)	۰/۲۷۳-۰/۲۷۳	۰/۲۷۲	۰/۰۰۱
غلظت ۵۰ TMZ (۲۴ ساعت)	۱/۰۸۱-۱/۶۸۶	۱/۳۱۰	۰/۶۷۰
غلظت ۱۰۰ TMZ (۲۴ ساعت)	۰/۴۶۵-۰/۵۲۵	۰/۴۹۳	۰/۰۰۱
غلظت ۲۵ TMZ (۴۸ ساعت)	۰/۹۲۵-۰/۹۴۷	۰/۹۳۶	۰/۰۰۱
غلظت ۵۰ TMZ (۴۸ ساعت)	۳۷/۳۹۹-۴۰/۱۴۶	۳۸/۷۷۵	۰/۰۰۱
غلظت ۱۰۰ TMZ (۴۸ ساعت)	۰/۰۰۱-۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱
غلظت ۲۵ TMZ (۷۲ ساعت)	۰/۳۹۵-۱/۱۷۵	۰/۵۳۶	۰/۶۶۹
غلظت ۵۰ TMZ (۷۲ ساعت)	۲۴/۷۲۳-۲۸/۸۸۶	۲۶/۶۳۰	۰/۰۰۱
غلظت ۱۰۰ TMZ (۷۲ ساعت)	۰/۲۸۱-۰/۲۸۱	۰/۲۸۱	۰/۰۰۱

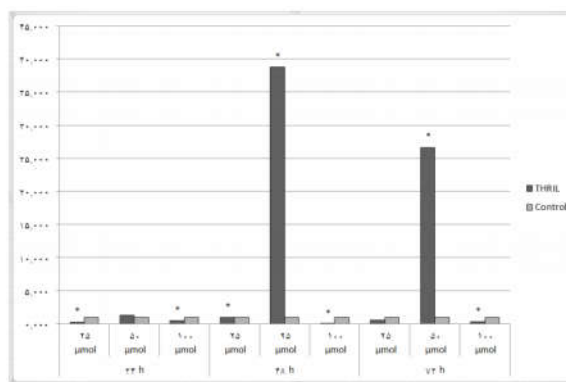
$P < 0/05$  به‌عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شده است.

در سلول‌های این گروه نسبت به سلول‌های گروه کنترل پس از تیمار با داروی تموزولامید، به‌صورت معنادار ( $P < 0/001$ ) تغییر کرده است، ولی افزایش بیان ژن فقط در غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  در مدت زمان ۷۲ ساعت، به‌میزان ۲۶/۶۳۰ مشاهده شد (جدول ۱).

تغییرات غلظت ۲۵  $\mu\text{M}$  دارو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: بیان ژن نسبت به ژن کنترل، در غلظت ۲۵  $\mu\text{M}$  زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، کاهش بیان به‌صورت با‌معنا بوده است و در زمان ۷۲ ساعت میزان بیان ژن نسبت به ژن کنترل به‌صورت بی‌معنا کاهش یافته است (جدول ۱).

تغییرات غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  دارو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: بیان ژن نسبت به ژن کنترل، در غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  زمان ۲۴ ساعت، افزایش بی‌معنا مشاهده شد. در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان بیان ژن نسبت به کنترل، افزایش بیان به‌صورت معنادار بوده است، ولی بیشترین بیان ژن *THRIL* مربوط به زمان ۴۸ ساعت غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  با میزان ۳۸/۷۷۵ بوده است (جدول ۱).

تغییرات غلظت ۱۰۰  $\mu\text{M}$  دارو در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت: بیان ژن نسبت به ژن کنترل در غلظت ۱۰۰  $\mu\text{M}$  در ۲۴، ۴۸ و ۷۲



نمودار ۱: نمودار ستونی تغییرات به‌دست‌آمده از سنجش بیان ژن *THRIL* و ژن مرجع *GAPDH* نسبت به زمان و غلظت.

سلول‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  از داروی شیمی‌درمانی تموزولامید که در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مقایسه شده‌اند.

بیان ژن به‌صورت کاهش بی‌معنا مشاهده شد. در غلظت‌های ۵۰  $\mu\text{M}$  (۲۶/۶۳۰) و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  (۰/۲۸۱)، طی آنالیزهای آماری بیان ژن *THRIL*.

افزایش بیان THRIL را نشان داد، نشانه‌ای برای از بین رفتن سلول‌های سرطانی و اثرکرد دارو است که از طریق مهار مسیر سیگنالی TNF- $\alpha$  که کنترل‌کننده یک مسیر آپوپتوزی و دو مسیر التهابی است می‌شود.

تحلیل آماری نتایج به‌دست‌آمده برای ژن THRIL نسبت به زمان: با توجه به سنجش تغییرات بیان ژن THRIL و ژن مرجع GAPDH، در زمان‌های مختلف براساس نمودار ستونی ۱ می‌توان اشاره کرد که بیان ژن THRIL، وابسته به زمان بوده که با افزایش زمان، بیان نیز به‌صورت معناداری تغییر کرده است. در نتیجه بیان ژن THRIL، در زمان خاص افزایشی (افزایش زمان)، نیز افزایش (افزایش بیان) می‌یابد که بیشترین بیان در ۴۸ ساعت رخ می‌دهد.

تحلیل آماری نتایج به‌دست‌آمده برای ژن THRIL نسبت به غلظت: با توجه به سنجش تغییرات بیان ژن THRIL و ژن مرجع GAPDH، در غلظت‌های مختلف براساس نمودار ۱، می‌توان اشاره کرد که بیان ژن THRIL، وابسته به غلظت بوده که با افزایش غلظت، بیان نیز به‌صورت معناداری تغییر کرده است. در نتیجه بیان ژن THRIL، در غلظت خاص افزایشی (افزایش غلظت)، نیز افزایش (افزایش بیان) می‌یابد. بنابراین بیشترین بیان ژن THRIL مربوط به زمان ۴۸ ساعت غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  از دارو با میزان ۳۸/۷۷۵ با  $P < 0.001$  است (نمودار ۱).

پیشبرد مسیر سیگنالی به‌سمت مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، به‌طور قطع همراه با کاهش و افزایش برخی دیگر از ژن‌های تأثیرپذیر در مسیر سیگنالی بوده است که با یافتن تغییرات بیان این ژن‌ها، مسیرهای درگیر در این روند و روش‌های درمانی جدیدی بر پایه مهار یا توسعه کارکرد LncRNA‌ها در سلول‌های سرطانی، به‌منظور بهبود وضعیت بیماری ابداع خواهد گردید. بنابراین به‌نظر می‌رسد می‌توان از اندازه‌گیری THRIL LncRNA به‌عنوان یک مارکر پایین‌دست TNF- $\alpha$  جهت شناسایی نوع اثرکرد دارو ارزیابی به‌عمل آورد. مطالعات بسیار زیادی مانند ارتباط بین تغییرات در بیان THRIL LncRNA کنترل‌کننده‌ی مسیر سیگنالی TNF- $\alpha$ ، در رده سلولی متفاوت تحت تیمار با داروی متفاوتی نیز می‌تواند انجام گیرد. در این مطالعه نشان داده شد که داروی تموزولامید در غلظت ۵۰  $\mu\text{M}$  و زمان ۴۸ ساعت تأثیر بالایی بر سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند. درحالی‌که در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  زمان کم (۲۴ ساعت) نتایج به‌طور کامل برعکس بوده و موجب توقف آپوپتوز و پیشرفت سلول‌های سرطان مغز (گلیوبلاستوما) می‌شود و در ۷۲

ساعت نیز کاهش یافته و از لحاظ آماری معنادار نیز بوده است (جدول ۱).

## بحث

مطالعه‌ای در جهت اثبات وجود LncRNA‌های در طی فعال‌سازی ماکروفاژهای THP1 انجام شد، Li و همکاران نتیجه گرفتند که THRIL، از طریق اتصال به HnmpL یک کمپلکس RNP تشکیل می‌دهد و رونویسی از ژن TNF- $\alpha$  را با اتصال به پروموتور آن تنظیم می‌کند. همچنین بیشتر LncRNA‌های ماکروفاژهای THP1 در طول فعال‌سازی TLR2 سرکوب شدند. ماکروفاژهای THP1 که توسط Pam3CSK4 (فعال‌کننده فاکتور NF-KB) تحریک شده بودند، افزایش بیان TNF- $\alpha$  و کاهش بیان Linc1992 ( $P < 0.05$ ) را نشان دادند. خاموش‌سازی ژن THRIL، منجر به کاهش تولید TNF- $\alpha$  می‌شود و THRIL، بیان TNF- $\alpha$  را از طریق یک فیدبک منفی تنظیم می‌کند. نتایج این مطالعات با نتایج مونوسیت‌های مشتق‌شده ماکروفاژ انسانی همخوانی داشته است. سلول‌ها در پژوهش فوق تحت تیمار با ۱۰۰ ng/ml PAM در طی ۲۴ ساعت بودند اما در پژوهش کنونی ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰  $\mu\text{M}$  در طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بوده است.<sup>۲۵</sup>

Imamura و همکاران طی پژوهشی در باب LncRNA‌های دخیل در پاسخ ایمنی THRIL را انجام داده و مسیر سیگنالی بیان‌شده را به آن در ارتباط دانسته‌اند.<sup>۲۶</sup> پژوهش کنونی را نیز می‌توان مکمل مطالعه فوق دانست، چراکه مطالعه کنونی با بررسی تأثیر داروی شیمی‌درمانی تموزولامید بر روی تغییرات بیان ژن THRIL LncRNA در رده سلولی T98G سعی در کنترل در بیان این ژن دانسته و مسیر سیگنالی TNF- $\alpha$  را مهار کرده است و سلول را به‌سوی آپوپتوزی پیش برد.<sup>۲۷</sup> اگر پژوهش کنونی بدون تیمار با داروی تموزولامید انجام می‌یافت بیان ژن THRIL نیز براساس مطالعه Li و همکاران کاهش می‌یافت.<sup>۱۳</sup> Durairaj MK و همکاران نشان دادند که در گلیوبلاستوما تیمار شده توسط داروی شیمی‌درمانی تموزولامید که بیان IRAK4 القا شده، منجر به کاهش IRAK1، مهار مسیر NFKB، مهار TLR، فعال‌سازی IRAK2 و القای آپوپتوز می‌شود. در نتیجه وجود و حضور IRAK4 القا شده توسط این دارو در سلول‌های گلیوما برای افزایش حساسیت شیمیایی و آپوپتوز سلول‌ها ضروری است. نتایج پژوهش کنونی که

تیمار با داروی شیمی‌درمانی تموزولامید<sup>۱۵</sup> در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۶ و کد ۵۶ می‌باشد که با همکاری مرکز علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان، انیستیتو پاستور ایران و با حمایت دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شد.

ساعت نیز سلول‌ها به سمت آپوپتوز با میزان کمتری پیشروی می‌کنند. سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه با عنوان "بررسی ارتباط بین تغییرات در بیان LncRNA THRIL کنترل‌کننده مسیر سیگنالی TNF- $\alpha$  در رده‌ی سلولی گلیوبلاستوما‌ی تومورهای مغزی تحت

## References

- Ahmadi J, Jahanbazi Jahan Abad A, Barahimi A, Atashi A. Introduction of long non-coding mas as novel biomarkers in central nervous system disorders. *Neuroscience J Shefaye Khatam* 2015;3(3):98-112.
- Bhatt A, Gumany E, Modi A, Gulbake A, Jain A. Theranostic Potential of Targeted Nanoparticles for Brain Cancer. *Mini Rev Med Chem* 2017;17(18):1758-1777.
- Bao H, Su H. Long noncoding RNAs act as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma: progress and prospects. *BioMed Res Int* 2017;2017:8.
- Carpenter S, Fitzgerald KA. Transcription of inflammatory genes: long noncoding RNA and beyond. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35(2):79-88.
- Chen YG, Satpathy AT, Chang HY. Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs. *Nat Immunol* 2017;18(9):962-972.
- Chu WM1. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 2013;328(2):222-5.
- Farajzadeh D, Karimi-Gharigh S, Dastmalchi S. Tumor necrosis factor-alpha and its inhibition strategies: review article. *Tehran Univ Med J* 2017;75(3):159-71.
- Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296(5573):1634-5.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10(1):45-65.
- Jakubowicz-Gil J, Langner E, Bądziul D, Wertel I, Rzeski W. Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumour Biol* 2013;34(4):2367-78.
- Lipovich L, Tarca AL, Cai J, Jia H, Chugani HT, Stemer KN, et al. Developmental changes in the transcriptome of human cerebral cortex tissue: long noncoding RNA transcripts. *Cereb Cortex* 2014;24(6):1451-9.
- Leitão AL, Enguita FJ, editors. Non-coding RNAs and inter-kingdom communication. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
- Li Z, Chao TC, Chang KY, Lin N, Patil VS, Shimizu C, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF $\alpha$  expression through its interaction with hnRNPL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(3):1002-7.
- Greene CM. MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs in Inflammation. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.
- Kumar DM, Patil V, Ramachandran B, Nila MV, Dharmalingam K, Somasundaram K. Temozolomide-modulated glioma proteome: role of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) in chemosensitivity. *Proteomics* 2013;13(14):2113-24.
- Magagula L, Gagliardi M, Naidoo J, Mhlanga M. Lnc-ing inflammation to disease. *Biochem Soc Trans* 2017;45(4):953-62.
- Mizoguchi M, Yoshimoto K, Sasaki T. Glioma of the central nervous system surveillance counterpoint: Japan. In: Johnson FE, Machara Y, Browman GP, Margenthaler JA, Audisio RA, Thompson JF, et al, editors. Patient Surveillance After Cancer Treatment. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. P. 521-3.
- Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet* 2012;205(12):613-21.
- Mumtaz PT, Bhat SA, Ahmad SM, Dar MA, Ahmed R, Urwat U, et al. LncRNAs and immunity: watchdogs for host pathogen interactions. *Biol Proced Online* 2017;19:3.
- Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 2012;81:145-66.
- Satpathy AT, Chang HY2. Long noncoding RNA in hematopoiesis and immunity. *Immunity* 2015;42(5):792-804.
- Schopohl P, Melzig MF. The influence of toll-like receptor (TLR-) agonists on lysozyme activity, TNF-alpha secretion and intercellular adhesion in THP-1 cells. *Pharmazie* 2014;69(8):602-9.
- Song E. The Long and Short Non-coding RNAs in Cancer Biology. Singapore: Springer International Publishing; 2016.
- Sun M, Kraus WL. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease. *Endocr Rev* 2015;36(1):25-64.
- Li Z, Chao TC, Chang KY, Lin N, Patil VS, Shimizu C, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF $\alpha$  expression through its interaction with hnRNPL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(3):1002-7.
- Imamura K, Akimitsu N. Long non-coding RNAs involved in immune responses. *Front Immunol* 2014;5:573.
- Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012;5(1):102-14.

## Relationship between LncRNA THRIL expression controlling TNF- $\alpha$ pathway in glioblastoma cell line under temozolomide treatment

Leila Hassani M.Sc. Student  
Golnaz Asaadi Tehrani Ph.D.  
Sina Mirza Ahmadi Ph.D.\*

Department of Molecular Genetics,  
Islamic Azad University, Zanjan  
Branch, Zanjan, Iran.

\* Corresponding author: Department of  
Molecular Genetics, Faculty of Basic  
Sciences, Islamic Azad University,  
Moalem St., Zanjan, Iran.  
Postal code: 4513966453  
Tel: +98 24 33421030  
E-mail: sinacanmir@yahoo.com

### Abstract

Received: 17 Apr. 2018 Revised: 24 Apr. 2018 Accepted: 07 Oct. 2018 Available online: 22 Oct. 2018

**Background:** Glioma is one of the most common and deadliest primary malignant tumors in the brain. A large part of the gene expression products are non-coding protein RNA. LncRNA THRIL gene is an antisense LncRNA and one of the most important mediators of the NF-KB signaling pathway, that express in many tissues of the body, including the central nerve system (CNS). The aim of the present study was to investigate the alternation in the expression of LncRNA THRIL gene in cells of the adenocarcinoma glioblastoma T98G cell line, under treatment with temozolomide chemotherapy drug.

**Methods:** This case-control study was conducted in Research Center of Islamic Azad University of Zanjan, Iran, from April to September 2017. Cells of T98G cell line was treated with various doses of temozolomide chemotherapy drug (25-50-100  $\mu$ M) and at different times (72-48-48 hours), Respectively RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Then LncRNA THRIL gene expression was studied by real-time PCR method and the results were analyzed by relative quantitative and livak methods.

**Results:** The THRIL gene expression in 24 hours' time with 25 and 100  $\mu$ M doses ( $P < 0.001$ ) had significant decreased expression and 50  $\mu$ M dose had non-significant increase. It had significant increase in 48 hours time with 50  $\mu$ M dose ( $P < 0.001$ ), except 25  $\mu$ M ( $P < 0.001$ ) and 100  $\mu$ M ( $P < 0.001$ ) doses had significant decreased expression. It had significant increase during 72 hours time with 50  $\mu$ M dose ( $P < 0.001$ ), in contrast 25  $\mu$ M ( $P > 0.001$ ) and 100  $\mu$ M ( $P < 0.001$ ) concentrations of temozolomide chemotherapy drug demonstrated decreased expression of the LncRNA THRIL gene ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** As a result, the THRIL gene expression alterations after cancer cells treatment by temozolomide chemotherapy drug depends on the time and dose of the drug and the 48 hours treatment time with 50  $\mu$ M dose ( $P < 0.001$ ) had the highest effect on cancer cells of the T98G cell line, due to the expression of the THRIL gene.

**Keywords:** LncRNA THRIL, polymerase chain reaction, TNF- $\alpha$ , T98G.