

## The Study of Expression of KI67 and P53 in Co-Culturing of Colon Epithelial Cell Line HT-29 with IL-17A

Ali Ghorbani Ranjbary<sup>1</sup>, Jalil Mehrzad<sup>2\*</sup>, Hesam Dehghani<sup>1, 3</sup>, Abbas Abdollahi<sup>4</sup>, Saman Hosseinkhani<sup>5</sup>

1. PhD and Postdoctoral Fellow, Department of Pathobiology, Section Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. professor, Stem Cells and Regenerative Medicine Research Group, Research Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Associate professor, Surgical Oncology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5. Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 2020/08/10

Accepted: 2021/11/02

### Abstract

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world. The role of IL-17A in cancer begins in the early stages of tumorigenesis and appears to play an important role in tumorigenesis by causing inflammation. The present study was conducted to investigate the expression of KI67 and P53 genes in HT-29 colon epithelial cells with IL-17A.

**Materials and Methods:** IL-17A was purchased and 50 ng/ml was added to HT-29 culture medium and after 24 hours the cells were isolated from the culture medium and cell necrosis was examined by MTT. Then RNA was extracted and the expression levels of P53 and KI67 were analyzed using newly designed primers by Reverse transcription (RT) qPCR method and GeniX6 software.

**Results:** The MTT test showed that a concentration of 150 ng/ml for 24 hours had maximal necrosis rate in HT-29. After 24 hours of IL-17A incubation, the expression of KI67 ( $P = 0.003$ ) and P53 ( $P = 0.001$ ) genes in HT-29 cells in the IL-17A exposed group decreased and increased, respectively. Also, compared to the control group the number of examined HT-29 cells in the IL-17A treated group showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results showed that IL-17A could inhibit HT-29 cell proliferation in vitro by increasing P53 expression and decreasing KI67. This could be a reason for further application of IL17a as a factor for immunotherapy and pathogenesis of the CRC.

**\*Corresponding Author:** Jalil Mehrzad  
**Address:** Tehran, University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and Immunology  
**Tel:** +98-21-61117053  
**E-mail:** mehrzad@ut.ac.ir

**Keywords:** KI67, P53, HT-29, IL17a, qPCR, cell culture, Squamous cell carcinoma

**How to cite this article:** Ghorbani Ranjbary A., Mehrzad J., Dehghani H., Abdollahi A., Hosseinkhani S. The Study of Expression of KI67 and P53 in Co-Culturing of Colon Epithelial Cell Line HT-29 with IL-17A, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2022; 29(1):141-153.

## Introduction

Cancer has always been one of the most fundamental problems of human societies. Despite the vast amount of research and development over the past decade, cancer remains one of the leading causes of death worldwide. According to recent statistics, cancer is the second leading cause of death in the world after cardiovascular disease. Interleukin 17A is a hemodimeric protein containing 23 amino acids with a molecular weight of 15 to 22 kDa.

The IL-17A receptor is widely expressed in a wide range of tissues and cell types. The IL-17A receptor causes spatial changes in IL-17A. Once IL-17A binds to its own receptor, it is thought to increase the affinity for the IL-17A receptor and send a stronger downstream signal into the cell. The role of IL-17A in cancer begins in the early stages of tumorigenesis, which has already played a role in the early stages of tumor formation by increasing its presence in the tumor microenvironment.

Genes that are activated in cancer are divided into two categories. The first group of suppressor genes, the P53 gene is the most important repression gene located in the short arm of chromosome 17 and is the most common target of genetic changes in humans and mutations in this gene are seen in about 50% of human tumors. Acquired mutations in this gene are very common, and in fact both alleles of the gene mutate during life and cause cancer. Such as airway carcinoma, breast and colon tumors. In the less common case, one of the gene alleles is inherited as mutated and the other allele is mutated until the age of 25 and the person gets cancer.

The second category is genes that promote or accelerate tumor growth, such as Ki67. The Ki67 gene is located on the long arm of chromosome 10 in humans. And its product is involved in the growth and proliferation of cancer.

Recent studies have shown that inflammation can cause cancer. The pro inflammatory cytokine IL-17A has been shown to play an important role in colon cancer in rat models.

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers in the world. The role of IL-17A in cancer begins in the early stages of tumorigenesis and appears to play an important role in tumorigenesis by causing inflammation. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the expression of Ki67 and P53 genes

in adjacent culture of HT29 colon cancer cells with IL-17A.

## Methodology

The present study was performed in the biotechnology department of Ferdowsi University of Mashhad and the central laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran in 1398 under the code of ethics IR IR.MUMS.REC.1398.42456. The HT-29 cell line was purchased from the Biotechnology Department (Cell Bank) of Ferdowsi University Central Laboratory and IL-17A (MBS506306) from MyBiosource USA. Cells in filtered flasks containing 90 cc of RPMI640 medium (GIPCO, USA) enriched with 10% fetal bovine serum (FBS). 100 µl of antibiotics (penicillin 0.01 /g / µL and streptomycin 0.01 µg / µL) were cultured in an incubator at 37 ° C and 5% carbon dioxide. Then, the cells were passaged and according to the calculations related to seed density, the cells were separated for the experiments and after counting, they were added to three-centimeter plates.

### - MTT

MTT is one of the water-soluble yellow tetrazolium salts, reduced by dehydrogenases in cell-activated mitochondria, and then deposits as insoluble formazan crystals in living cells. These crystals are purple, and their purple color value is proportional to cell activity and the number of living cells. Briefly, 100 µl/ml of medium containing cells at a density of cells/ml was seeded in each well of a flat-bottom 96-well plate. Cells were permitted to adhere to the plate for 24 h (5% CO<sub>2</sub> and 37°C). Then, 100 µl RPMI 1640 medium containing different concentrations of (0, 50, 100, and 150 ng/ml) IL-17a was incubated for 24 h. After the above time, 20 µl MTT with a concentration of 5 g/l was added to each well and placed in the incubator at 37°C for 3 hours. DMSO (100 µl/ml) was used as the positive control, and wells were left with no cells for the negative control. Finally, after 15 minutes of incubation at room temperature, the optical absorption of the plate was measured by a spectrophotometer at 570 nm. To obtain better results and ensure the accuracy of the obtained results, each experiment was repeated five times. The percentage of the viable cells was calculated using the following formula:

### - Cell Culture and Grouping

After initial culture and counting,  $3 \times 10^5$  HT-29 cells/ml were transferred to 6-well plates and divided into two groups including group 1, HT-29 cells, according to the results of MTT, with  $50 \mu\text{g/ml}$  IL-17a, and group 2, only HT-29 cells as the control group. After 24 and 48 hours of culture, mRNA and protein level expressions are evaluated by RT-PCR and western blot, respectively.

### - Primer Design and Quality Analysis by Agarose Gel

In this study, after obtaining exon sequences from NCBI (National Center for Biotechnology Information) and Ensembl, investigated primers were designed on two exons or as forward or reverse on the junction of two exons by Beacon Designer. Then, using Beacon, Oligo, and NCBI, Primer-BLAST was performed and primers were investigated for the position and extra bands. Then, after ordering and purchasing primers, they were diluted and used according to the manufacturer's protocol (Table 1). Total RNA extraction was performed using Dena Zist Asia (S-1010-1), Iran. After analyzing nanodrop and agarose gel, it was converted to cDNA by Yekta Tajhiz Azma (YTA (Cost No. YT4500, Iran)) kit. Then, for denaturation, according to the binding temperature, cDNA strands were heated at  $95^\circ\text{C}$  for 10 minutes; then, a 40-cycle period consisting of  $95^\circ\text{C}$  in 10 seconds,  $60^\circ\text{C}$  in 20 seconds, and  $72^\circ\text{C}$  in 20 seconds was used for PCR, and the quality analysis of primer-based PCR products was investigated primers in 2% agarose gel.

## Results

### MTT Assay Revealed Proapoptotic Properties of IL-17a on Epithelial Cancer Cells

This assay was performed to identify the concentration of IC<sub>50</sub>. The highest death was obtained in the concentration of  $200 \mu\text{g/ml}$  at 24 hours after treatment (Figure 2). Then, according to the MTT results, the concentration of  $50 \mu\text{g/ml}$  of IL-17a was used to analyze its effect on the expression of apoptosis-associated genes. Indeed, according to the optical density-based MTT assay of IL-17a un/treated HT-29 cells, the IL-17a behaved in a dose-dependent manner in these cancerous cells.

## Discussion

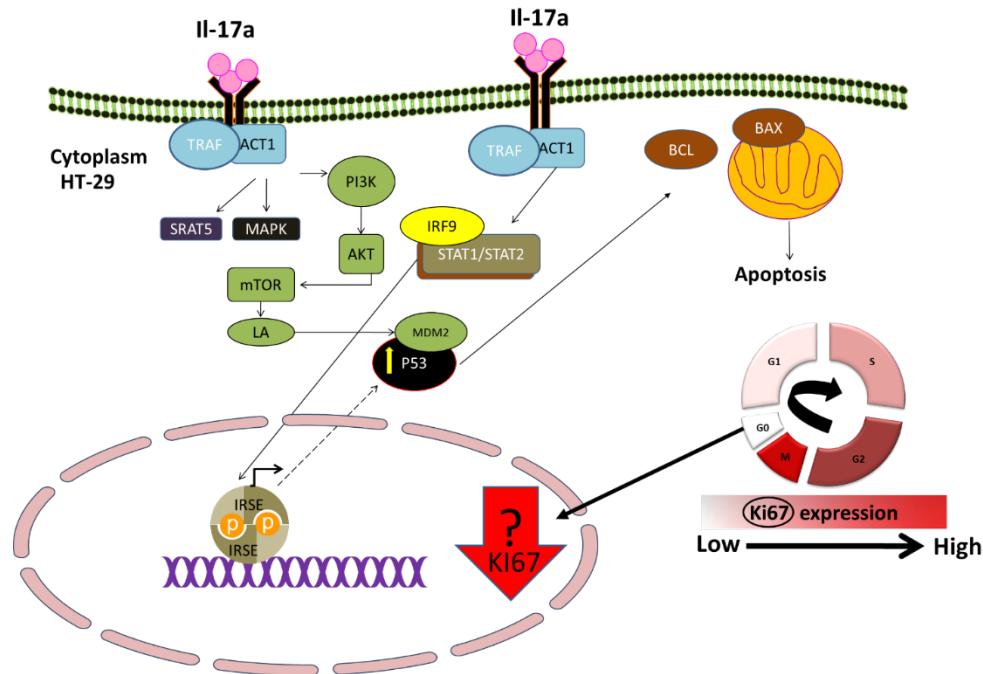
The results of the present study showed that IL-17A reduces the number of cells as well as morphological changes in HT-29. Also, the expression level of P53 in cells exposed to IL-17A showed an increase in expression compared to the control group. These changes can lead cells to apoptosis. A study by Jordan et al. in 2013 showed that P53 is a tumor suppressor that induces apoptosis. Other studies have shown the mechanism of tumor suppression. Thus, P53 acts as a transcription factor for a set of pro-apoptotic proteins from the BCL family (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA, etc.), which ultimately induces mitochondrial permeability and the release of cytochrome C. Cytochrome C is essential for the activation of Apaf1. This protein is critical for activation of various caspases pathway. P53 also induces ASC (Apoptosis-associated Speck-like Protein), which is involved in the placement of Bax protein in mitochondria and the induction of mitochondrial membrane permeability for cytochrome C release (18-16). A study by Gouda et al. in 2018 showed that there is a direct relationship between IL-17A and P53 expression in smokers. Which is consistent with the results of the present study. But in another study, Gouda et al. showed that IL-17A was involved in modulating the p53-fibrinolytic system and epithelial cell apoptosis in BLM-induced mice.

The expression level of KI67 in cells exposed to IL-17a showed a decrease in expression compared to the control group. The KI67 gene is a proto-oncogene that is active in cell proliferation. Recent studies have also shown that KI67 gene expression is strongly associated with tumor cell proliferation and growth. Clinically, KI67 has been shown to be associated with metastasis and clinical stage of tumors. In addition, KI67 expression has been shown to be significantly higher in tumor tissue than in healthy tissue. KI67 is a nuclear protein that stimulates cell proliferation through its effect on cell cycle. In the study of Iain Miller et al. in 2018, it was found that the expression and accumulation of KI67 in G<sub>2</sub>, S, M increases and decreases in stages G<sub>1</sub> and G<sub>0</sub>. Which indicates the effect on tumor cell proliferation, although its exact mechanism has not yet been determined.

The results of this study showed that IL-17A increased the expression of P53. It also reduces KI67 at the mRNA level of HT-29 cells by an unknown mechanism. Taken together, these

changes are directed at HT-29 cells leading to apoptosis (see schematic Figure). Therefore, in this study, it was determined that IL-17A, in addition to causing inflammation and helping tumor genesis, it can also have the effect of suppressing the growth and proliferation of cancer cells. Further studies are

also suggested to investigate the underlying reason for the decrease mRNA expression of KI67 and increase mRNA of P53 in IL-17A-exposed colorectal epithelial cells. Particular attention should also be taken into account of protein secretion of these tumor related molecules.



**Schematic Figure.** Here the scheme depicts the role of KI67 and P53 in apoptosis and cell cycle of epithelial cells (particularly the colorectal epithelia). Also, the mechanism of P53 amplification by the downstream signal of the IL-17a receptor is depicted. The IL-17A receptor also increases P53 expression by activating Act1 and TRAF6 STAT1 / 2 and IRSE, as well as the PI3K pathway.

**Conclusion**

The results showed that IL-17A could inhibit HT-29 cell proliferation in vitro by increasing P53 expression and decreasing KI67. This could be a reason for further application of IL17a as a factor for immunotherapy and pathogenesis of the CRC.

**Acknowledgment**

The present study is part of the dissertation for obtaining a doctorate in biotechnology, which was conducted at Ferdowsi University of Mashhad, Ghaem Hospital and the University of Tehran. The

authors of the article thank the Vice Chancellor for Research and the staff of the Central Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Ferdowsi University and Ghaem Hospital. Finally, the authors hereby express their gratitude to all the individuals and organizations who assisted us in this research and made this research possible.

**Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## بررسی میزان بیان ژن های KI67 و P53 در کشت هم جوار سلول های اپیتلیوم کولون HT-29 با IL-17A

علی قربانی رنجبری<sup>۱</sup>، جلیل مهرزاد<sup>۲\*</sup>، حسام دهقانی<sup>۳</sup>، عباس عبدالهی<sup>۴</sup>، سامان حسینخانی<sup>۵</sup>

۱. دکتری و پسادکتری میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. استاد، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران ایران
۳. استاد، گروه علوم پایه و انستیتو بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۴. گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. استاد، گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** سرطان کولون از سرطان های رایج در جهان است. نقش IL-17A در سرطان از مراحل اولیه تومورزایی شروع می شود و به نظر می رسد با ایجاد التهاب، نقش مهمی در تومورزایی دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان بیان ژن های KI67 و P53 در سلول های اپیتلیوم کولون HT-29 تیمار شده با IL-17A می باشد.

**مواد و روش ها:** IL-17A خریداری شد و به میزان 50 ng/ml، به محیط کشت HT-29، اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت سلول ها از محیط کشت جدا شد و نکروز سلولی با MTT بررسی گردید. سپس استخراج RNA صورت گرفت و میزان بیان P53 و KI67، با استفاده از پرایمر های جدید طراحی شده از روش Reverse transcription (RT) qPCR انجام و با نرم افزار GeniX6، مورد آنالیز قرار گرفت.

**یافته ها:** آزمایش MTT نشان داد که غلظت 150 ng/ml بیشترین کشندگی طی ۲۴ ساعت را دارد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با IL-17A، میزان بیان ژن های KI67 ( $P=0.003$ ) و P53 ( $P=0.001$ ) در سلول های HT-29 در گروه تیمار شده با IL-17A به ترتیب، کاهش و افزایش یافت. همچنین تعداد سلول های مورد بررسی (HT-29) در گروه تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج حاصل نشان داد IL17a می تواند با افزایش بیان P53 و کاهش KI67 موجب جلوگیری از تکثیر سلول های HT-29 در شرایط آزمایشگاهی شود. این می تواند زمینه ای برای استفاده از IL17a به عنوان عاملی برای ایمونوتراپی و پاتوژنز سرطان روده بزرگ باشد.

\* نویسنده مسئول: جلیل

مهرزاد

نشانی: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۲۱۶۶۹۳۳۲۲۲

رایانامه:

mehrzad@ut.ac.ir

شناسه ORCID:

0000-0001-8174-5431

شناسه ORCID نویسنده اول:

0000-0003-0031-0028

### کلیدواژه ها:

KI67، P53، HT29 و IL17a،

qPCR، کشت سلول، سرطان

سلول های سنگفرشی

### مقدمه

در جهان پس از بیماری های قلبی - عروقی به شمار می آید (۱) - (۳). اینترلوکاین IL-17A یک پروتئین همودایمری، شامل ۲۳ اسید آمینه و دارای وزن مولکولی ۱۵ تا ۲۲ کیلو دالتون می باشد (۴). رسپتور اینترلوکاین IL-17A به طور گسترده ای در دامنه وسیعی از بافت ها و انواع سلول ها بیان می شود (۵). رسپتور

سرطان، همواره یکی از اساسی ترین مشکلات جوامع بشری بوده است. علی رغم تعداد زیاد پژوهش ها و تحولات در دهه گذشته، سرطان همچنان یکی از مهم ترین دلایل مرگ در سطح جهانی می باشد. طبق آمار اخیر، سرطان، دومین عامل مرگومیر

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۹، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۱، ص ۱۵۳-۱۴۱

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: [journal@medsab.ac.ir](mailto:journal@medsab.ac.ir)

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین  $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) و استرپتومایسین  $0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ )، در انکوباتور در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شد. سپس، سلول‌ها پاساژ داده شد و با توجه به محاسبات مربوط به Seeding density، موردنظر برای انجام آزمایش‌ها، سلول‌ها جداسازی و پس از شمارش به پلیت‌های سه سانتی اضافه شد.

### ۱.۲. تست MTT

MTT، یکی از نمک‌های تترازولیوم به رنگ زرد محلول در آب است که به‌وسیله دهیدروژنازهای موجود در میتوکندری‌های فعال سلولی احیا می‌شود و سپس به شکل کریستال‌های فورمازان و غیرمحلول در آب، در سلول‌های زنده رسوب می‌کنند. این کریستال‌ها به رنگ بنفش هستند و میزان رنگ بنفش آن متناسب با فعالیت سلولی و تعداد سلول‌های زنده می‌باشد. برای انجام این آزمون، ابتدا حدود  $5 \times 10^4$  عدد سلول (پس از شمارش به‌وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو) در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سپس با  $0, 50, 100, 150 \text{ ng/ml}$  IL17a در زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های مذکور به هر خانه پلیت ۲۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (مرک آلمان) اضافه شد. در نهایت پس از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نوری پلیت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. به‌منظور حصول نتیجه بهتر و اطمینان از صحت نتایج به‌دست‌آمده، هر کدام از آزمایش‌ها ۵ بار تکرار شدند. درصد سلول‌های زنده طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نمونه کنترل}}{\text{میانگین جذب نمونه تیمار}} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

### ۲.۲. کشت و گروه‌بندی

پس از کشت اولیه و شمارش تعداد  $3 \times 10^5$  سلول HT-29 را به پلت‌های سه سانتی انتقال و به دو گروه شامل یک HT-29 و میزان  $50 \text{ ng/ml}$  IL-17A گروه دو فقط HT-29 به‌عنوان گروه کنترل پس از کشت ۲۴ ساعته استخراج RNA انجام و آنالیز ریل تایم PCR، انجام شد.

### ۲.۳. طراحی پرایمر و آنالیز کیفیت آن به‌وسیله ژل آگاروز

در مطالعه حاضر پس از اخذ توالی اگزون از دو پایگاه اینترنتی

اینترلوکاین IL-17A باعث ایجاد تغییرات فضایی در اینترلوکاین IL-17A می‌شود. تصور می‌گردد پس از اتصال IL-17A به رسپتور خودش باعث افزایش میل ترکیبی با رسپتور IL-17A می‌شود و سیگنال پایین دست قوی‌تری به داخل سلول ارسال می‌گردد (6). نقش IL-17A در سرطان از مراحل اولیه تومورزایی شروع می‌شود که قبلاً با افزایش حضور آن در محیط ریزتومور، در اولین مراحل تشکیل تومور نقش داشته است (7-9).

ژن‌هایی که در سرطان فعال می‌شوند به دو دسته تقسیم می‌گردند:

دسته اول ژن‌های سرکوب‌گر که ژن P53 مهم‌ترین ژن سرکوب‌گری است که در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ قرار دارد و رایج‌ترین هدف، تغییرات ژنتیکی در انسان است و جهش در این ژن در حدود ۵۰ درصد از تومورهای انسانی دیده می‌شود. حالت اکتسابی جهش در این ژن، بسیار شایع می‌باشد و در حقیقت هر دو آلل ژن در طول زندگی جهش می‌یابند و ایجاد سرطان می‌کنند؛ مانند کارسینوماى مجاری تنفسی، تومور پستان و کولون. در حالت غیرشایع‌تر نیز یکی از آلل‌های ژن به‌صورت جهش‌یافته به ارث می‌رسد و آلل دیگر نیز تا ۲۵ سالگی جهش می‌یابد و فرد سرطان می‌گیرد (10 و ۱۱).

دسته دوم ژن‌هایی هستند که باعث پیشرفت یا تسریع در رشد تومور نظیر Ki67 می‌شوند. ژن Ki67 بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ در انسان قرار دارد و محصول آن در رشد و تکثیر سرطان نقش دارد (12 و ۱۳).

در مطالعات اخیر مشخص شده است التهاب می‌تواند موجب ایجاد سرطان شود. نشان داده شده است که سیتوکین پیش‌التهابی IL-17A نقش مهمی در سرطان روده بزرگ در مدل‌های موش دارد؛ از این رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی میزان بیان ژن‌های Ki67 و P53 در کشت هم‌جوار سلول‌های سرطانی کولون HT29 با IL-17A می‌باشد.

### ۲. مواد و روش

مطالعه حاضر در بخش بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۸ به کد اخلاق IR.MUMS.REC.1398.42456 انجام شد. رده سلولی HT-29 از بخش بیوتکنولوژی (بانک سلول) آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی و IL-17A (MBS506306)، از شرکت MyBiosource آمریکا خریداری شد. سلول‌ها داخل فلاکس فیلتردار حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت RPMI640 (شرکت گیپکو، آمریکا) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS).

## ۲.۴. ریل تایم و آنالیز

تمامی نمونه‌های بیولوژیک به صورت سه تکرار در دستگاه ریل تایم مدل Rotor-Gene Q 2.3.5 شرکت روتورژن قرار داده شد و طبق پروتکل دمایی ۹۵ درجه برای جداسازی رشته‌های cDNA، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس یک دوره ۴۰ سیکلی شامل ۹۵ در ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه برای تکثیر و خوانش استفاده شد. در این آزمایش از کیت مستر میکس و سایبرگرین شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. ابتدا استاندارد کرو به منظور نرمالایز بودن cDNA انجام شد. سپس منحنی ذوب و CT در هر سمپل، آنالیز گردید.

آنالیز اولیه به وسیله نرم افزار GeneX v6.7 انجام شد و تمام نتایج برحسب دلتا دلتا سی تی و لوگ دو محاسبه گردید. سپس با نرم افزار گرف پد پریسم ورژن ۸ آنالیز آماری شد.

NCBI و Ensembl، به وسیله نرم افزار Beacon Designer، پرایمرهای مورد بررسی روی دو اگزون یا به صورت وجود فوروارد یا ریورس بر محل اتصال دو اگزون طراحی شد. در ادامه از دو نرم افزار Beacon و Oligo و پایگاه NCBI پرایمرها مورد بلاست از نظر جایگاه، هرپین و باند اضافه بررسی گردید. در ادامه پس از سفارش و خریداری پرایمرها طبق پروتکل شرکت سازنده رقیق گردید و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

استخراج Total RNA، با استفاده از کیت دنازیست آسیا برای سلول انجام شد و پس از آنالیز نانو دراپ و ژل آگاروز، توسط کیت یکتا تجهیز آزما به cDNA تبدیل شد. در ادامه با توجه به دمای اتصال از فرمول دمایی ۹۵ درجه برای جداسازی رشته‌های cDNA، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس یک دوره ۴۰ سیکلی شامل ۹۵ درجه در ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه در ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه برای PCR و آنالیز کیفیت پرایمرهای مورد بررسی در ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن های هدف و کنترل داخلی

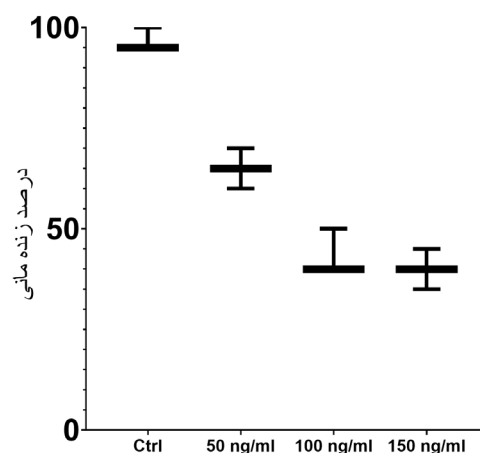
Gene (ENST)	Sequence (5' – 3')	Amplimer Tm (°C)	Length (bp)
P53(ENST00000617185.4)	F: CGATGGTGTACTTCCTGATA R: CAGCTCTCGGAACATCTC	60	84
Ki67 AJ567756.1	F: TCCTTTGGTGGGCACCTAAGACCTG R: TGATGGTTGAGGTCGTTTCTTGATG	61	156
B-ACTIN (ENST00000515712.1)	F: CTACCTTCAACTCCATCA R: GAGCAATGATCTTGATCTTC	60	165

## ۳. یافته‌ها

### ۳.۱. تست MTT

این تست برای شناسایی ۵۰ درصد کشندگی غلظت انجام شد.

بیشترین کشندگی در غلظت 150ng/ml IL-17A در ۲۴ ساعت پس از تیمار به دست آمد (تصویر ۱). سپس با توجه به نتایج آزمون MTT و رفرانس (۱۴) از غلظت 50ng/ml IL-17A برای آنالیز تأثیر بر بیان ژن های مورد مطالعه استفاده شد.

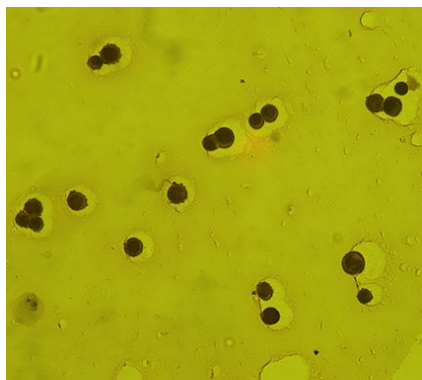


تصویر ۱. درصد زنده مانی سلول های تیمار شده با IL-17A

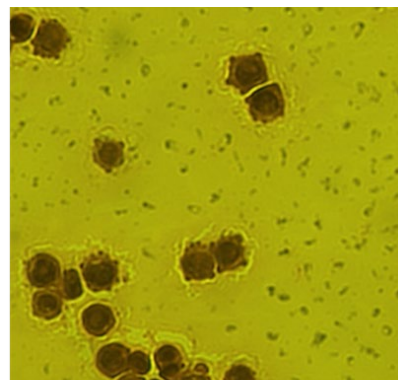
### ۲.۲. تعداد سلول‌ها

در گروه ۲۴ ساعت تحت تأثیر IL-17A نسبت به گروه کنترل، کاهش آماری معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین از نظر مورفولوژی سلول‌ها ظاهری شبیه به آپاپتوز و دندان‌دندانه شدن را نشان دادند (تصویر ۲).

تعداد سلول‌های HT-29 در ۲۴ ساعت پس از کشت با IL-17A بررسی گردید و از سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت عکس تهیه شد که تغییرات مورفولوژی و تعداد سلول‌ها ثبت گردید. تعداد سلول‌ها



Ctrl



IL17-a  
(50ng/ml)

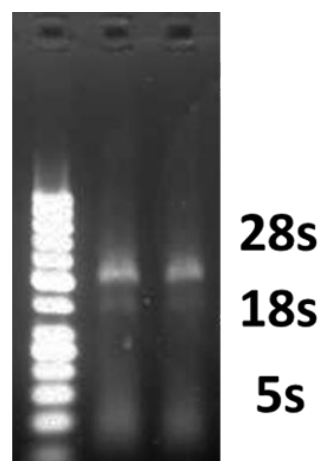
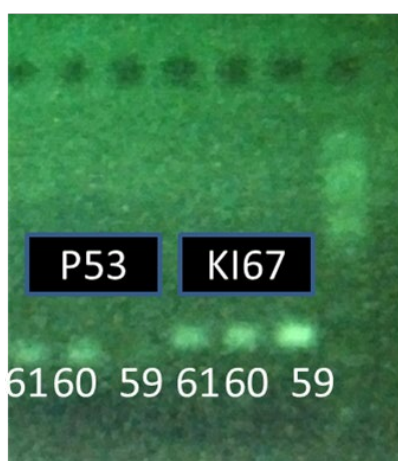
تصویر ۲. مورفولوژی سلول‌های مورد بررسی در دو گروه کنترل و مواجهه یافته با IL-17A، ساختار تغییر یافته سطح سلول و کنگره‌کنگره بودن سلول‌ها در گروه مواجهه یافته با IL-17A در تصویر مشخص است.

### ۳.۳. استخراج RNA

که میانگین OD نمونه‌ها 540 ng/microl (220-830ng) و نسبت OD برابر ۱.۹۶ بود.

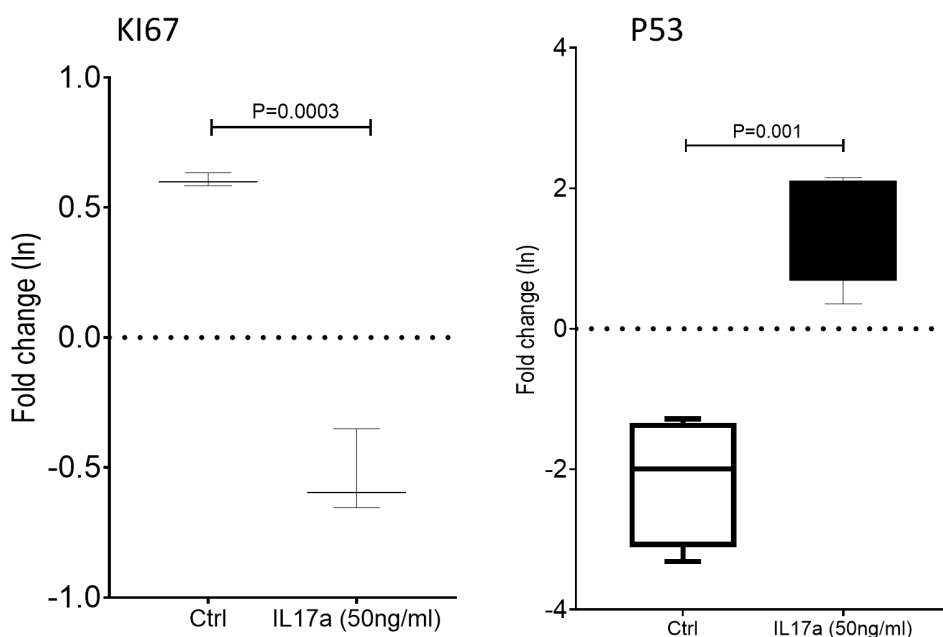
میزان بیان ژن P53 در گروه دریافت کننده IL-17A بیشتر از گروه کنترل بود ( $P=0.001$ ) اما میزان بیان ژن KI67، در گروه دریافت کننده IL-17A کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ( $P=0.0003$ ).

RNA، نمونه کنترل و تیمار شده با IL-17A، به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت، الکتروفورز گردید. تصویر ۳ نشان می‌دهد که استخراج RNA، به خوبی انجام شده است و برای سنتز cDNA مناسب می‌باشد. به منظور اطمینان از نتایج الکتروفورز و همچنین کنترل کمی، RNAهای استخراج شده با نانودراپ ارزیابی شدند



تصویر ۳. سمت راست RNA، استخراج شده از گروه کنترل و گروه مواجهه یافته با IL-17A، سمت چپ تصویر عکس مربوط به ژل الکتروفورز P53 و KI67





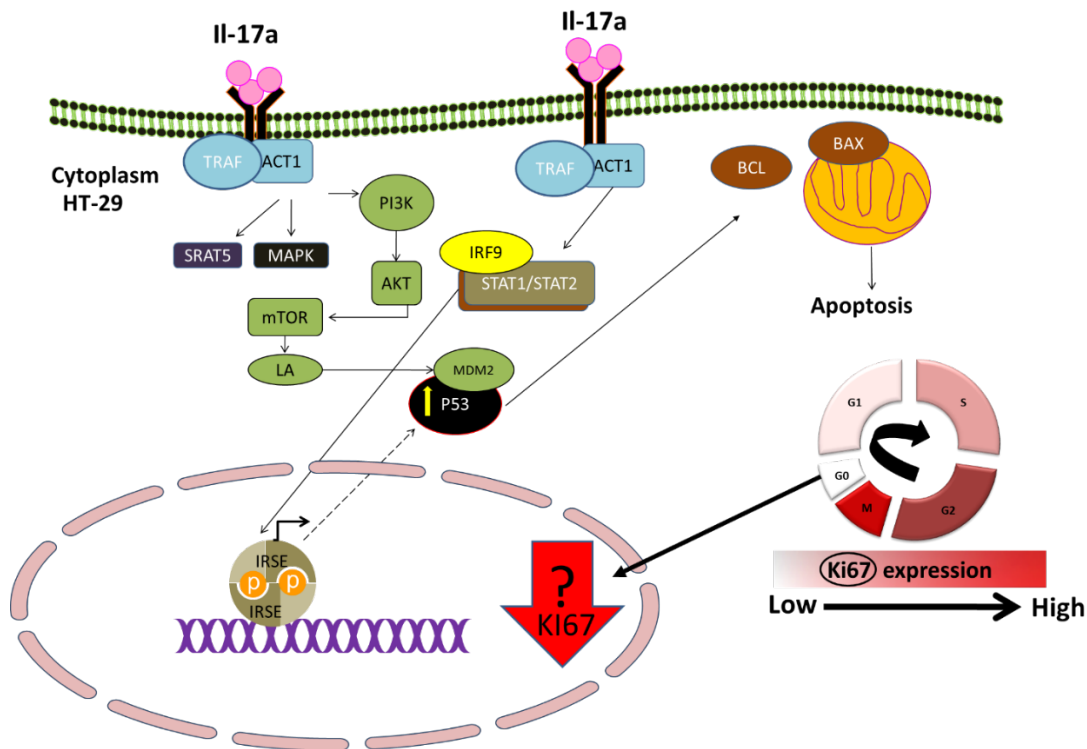
تصویر ۴. میزان تغییر بیان ژن P53 و KI67 براساس Fold change، در سلول های HT-29

میزان بیان KI67 در سلول های مواجهه یافته با IL-17a کاهش بیان نسبت به گروه کنترل را نشان داد. ژن Ki67 یک پروتئین کوژن است که در روند تکثیر سلولی، فعال است (۲۱). مطالعات سال های اخیر نشان داده است که بیان ژن KI67 به شدت با تکثیر و رشد سلول های توموری، مرتبط است (۲۲). از نظر بالینی، نشان داده شده است که KI67 با متاستاز و مرحله بالینی تومورها ارتباط دارد. علاوه بر این، نشان داده شده است که بیان KI67 به طور قابل توجهی در بافت توموری نسبت به بافت سالم، بیشتر می باشد (۲۳). KI67، پروتئین هسته ای می باشد که از طریق تأثیر بر سیکل سلولی، باعث تکثیر سلول می شود (۲۴). در مطالعه Iain Miller و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص شد میزان بیان و تجمع KI67 در G2, S, M بالا می رود و در مراحل G1 و G0 به حداقل می رسد که نشان دهنده تأثیر بر تکثیر سلول های توموری می باشد هر چند هنوز مکانیسم دقیق آن مشخص نشده است (۲۵).

نتایج این مطالعه نشان داد IL-17A باعث افزایش میزان بیان P53 می شود و با مکانیسم ناشناخته ای نیز باعث کاهش KI67 در سطح mRNA، سلول های HT-29 می شود. در مجموع این تغییرات برای سوق دادن سلول های HT-29 به سمت آپتوز است (تصویر ۵). بنابراین در این مطالعه مشخص شده IL-17A علاوه بر ایجاد التهاب و کمک به تومورزایی می تواند موجب تأثیرات ساپرس کردن رشد و تکثیر سلول های سرطانی نیز شود. همچنین مطالعات بیشتر به منظور کشف دلیل کاهش KI67 و افزایش بیان P53 بر اثر مواجهه شدن با IL-17A پیشنهاد می شود.

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد IL-17A، باعث کاهش تعداد سلول ها و همچنین تغییرات مورفولوژیکی در HT-29 می شود. همچنین میزان بیان P53 در سلول های مواجهه یافته با IL-17A افزایش بیان نسبت به گروه کنترل را نشان داد. این تغییرات می تواند سلول ها را به سمت آپتوز هدایت کند. مطالعه Jordan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد P53 سرکوب کننده تومور می باشد که باعث آپتوز می شود (۱۵). مطالعات دیگر، مکانیسم سرکوب کننده تومور را نشان دادند؛ به نحوی که P53، برای مجموعه ای از پروتئین های پروآپتوزی از خانواده BCL (Puma, Bax, Bid, Noxa) به منزله عامل رونویسی عمل می کند که در نهایت باعث القای نفوذپذیری میتوکندری و آزادسازی سیتوکروم C می شود. سیتوکروم C برای فعال سازی Apaf1، ضروری است. این پروتئین در فعال کردن مسیر فعال سازی کاسپازها حیاتی می باشد. P53 همچنین (ASC (- Apoptosis-associated Speck-like Protein) را القا می کند که در قرارگیری پروتئین Bax در میتوکندری و القای نفوذپذیری غشای میتوکندری برای آزاد شدن سیتوکروم C نقش دارد (16-18). مطالعه Gouda و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد بین بیان IL-17A و P53 در افراد سیگاری، ارتباط مستقیم وجود دارد (۱۹) که با نتایج مطالعه حاضر، همخوانی دارد. اما در مطالعه دیگری Gouda و همکاران نشان دادند IL-17A در تعدیل سیستم p53-fibrinolytic و آپتوز سلول اپیتلیال در موش های ناشی از BLM نقش دارد (۲۰).



تصویر ۵. در اینجا نقش پررنگ P53 و Ki67 در آپتوز و سیکل سلولی به صورت شماتیک، مشخص است، همچنین مکانیسم افزایش P53 به وسیله سیگنال پایین دست رسپتور IL-17a، به تصویر کشیده شده است. همچنین رسپتور IL-17a از طریق فعال سازی Act1 و STAT1/2 و TRAF6 و IRSE و نیز مسیر PI3K موجب افزایش بیان P53 می شود (۲۵، ۲۶ و ۲۷).

## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، بخشی از پایان نامه، برای اخذ مدرک دکترای تخصصی بیوتکنولوژی می باشد که در دانشگاه فردوسی مشهد،

بیمارستان قائم و دانشگاه تهران انجام پذیرفته است. نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و کارمندان آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دانشگاه فردوسی و بیمارستان قائم قدردانی می کنند.

## References

- [1]. Ranjbar AG, Mehrzad J, Dehghani H, Abdollahi A, Hosseinkhani S. Variation in blood and colorectal epithelia's key trace elements along with expression of mismatch repair proteins from localized and metastatic colorectal cancer patients. *Biological Trace Element Research*. 2020; 194(1):66-75.
- [2]. Bade BC, Cruz CS. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine*. 2020; 41(1):1-24.
- [3]. Pardini B, Corrado A, Paolicchi E, Cugliari G, Berndt SI, Bezieau S, Bien SA, Brenner H, Caan BJ, Campbell PT, Casey G. DNA repair and cancer in colon and rectum: Novel players in genetic susceptibility. *International journal of cancer*. 2020; 146(2):363-72.
- [4]. Wang K, Kim MK, Di Caro G, Wong J, Shalapour S, Wan J, Zhang W, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Wu LW, Taniguchi K. Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity*. 2014; 41(6):1052-63.
- [5]. Mombelli S, Cochaud S, Merrouche Y, Garbar C, Antonicelli F, Laprevotte E, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bastid J, Bensussan A. IL-17A and its homologs IL-25/IL-17E recruit the c-RAF/S6 kinase pathway and the generation of pro-oncogenic LMW-E in breast cancer cells. *Scientific reports*. 2015; 5(1):1-0.
- [6]. You Z, Guo N, Shen G, Zhang Y, Moustafa AA, Ge D. Interleukin-17 promotes migration and invasion of human cancer cells through upregulation of MTA1 expression. *Frontiers in oncology*. 2019; 9:546.
- [7]. Hurtado CG, Wan F, Housseau F, Sears CL. Roles for interleukin 17 and adaptive immunity in pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2018; 155(6):1706-15.
- [8]. Dawod B, Liu J, Gebremeskel S, Yan C, Sapping A, Johnston B, Hoskin DW, Marshall JS, Wang J. Myeloid-derived suppressor cell depletion therapy targets IL-17A-expressing mammary carcinomas. *Scientific reports*. 2020; 10(1):1-7.
- [9]. Ferreira N, Mesquita I, Baltazar F, Silvestre R, Granja S. IL-17A and IL-17F orchestrate macrophages to promote lung cancer. *Cellular Oncology*. 2020:1-2.
- [10]. Muller PA, Vousden KH. P53 mutations in cancer. *Nature cell biology*. 2013; 15(1):2-8.
- [11]. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death & Differentiation*.

- 2019; 26(2):199-212.
- [12]. Rimm DL, Leung SC, McShane LM, Bai Y, Bane AL, Bartlett JM, Bayani J, Chang MC, Dean M, Denkert C, Enwere EK. An international multicenter study to evaluate reproducibility of automated scoring for assessment of Ki67 in breast cancer. *Modern Pathology*. 2019; 32(1):59-69.
- [13]. Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C, Easton DF, Sherman ME, Garcia-Closas M, Dowsett M, Pharoah PD. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and Ki67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Modern Pathology*. 2019; 32(9):1244-56.
- [14]. Guo X, Jiang X, Xiao Y, Zhou T, Guo Y, Wang R, Zhao Z, Xiao H, Hou C, Ma L, Lin Y. IL-17A signaling in colonic epithelial cells inhibits pro-inflammatory cytokine production by enhancing the activity of ERK and PI3K. *PLoS one*. 2014; 9(2):e89714.
- [15]. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003; 22(56):9030-40.
- [16]. Tiwari M. Apoptosis, angiogenesis and cancer therapies. *J Cancer Ther Res*. 2012; 1(1):3.
- [17]. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9(6):653-60.
- [18]. Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2001; 61(18):6660-4.
- [19]. Gouda MM, Shaikh SB, Chengappa D, Kandhal I, Shetty A, Bhandary Y. Changes in the expression level of IL-17A and p53-fibrinolytic system in smokers with or without COPD. *Mol Biol Rep*. 2018 Dec; 45(6):2835-2841.
- [20]. Gouda MM, Bhandary YP. Curcumin down-regulates IL-17A mediated p53-fibrinolytic system in bleomycin induced acute lung injury in vivo. *J Cell Biochem*. 2018 Sep; 119(9):7285-7299.
- [21]. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica Chimica Acta*. 2019; 491:39-45.
- [22]. Yuan JP, Wang LW, Qu AP, Chen JM, Xiang QM, Chen C, Sun SR, Pang DW, Liu J, Li Y. Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on ki67 and cytokeratin to improve ki67 assessment in breast cancer. *PLoS one*. 2015; 10(4):e0122734.
- [23]. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer biology & medicine*. 2016; 13(4):496.
- [24]. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell reports*. 2018; 24(5):1105-12.
- [25]. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death & Differentiation*. 2018; 25(1):104-13.
- [26]. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*. 2011; 3(1):994-1013.
- [27]. Uroz M, Wistorf S, Serra-Picamal X, Conte V, Sales-Pardo M, Roca-Cusachs P, Guimerà R, Trepat X. Regulation of cell cycle progression by cell-cell and cell-matrix forces. *Nature cell biology*. 2018; 20(6):646-54.