

Evaluation of Changes in the Expression of SETD1B and Lncrna LIMT Genes in Colorectal Tumor Tissues Compared to Healthy Tissues

Helmah Kargar¹, Maryam Peymani^{2*}

1. Msc of Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Associate professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Received: 2020/12/30

Accepted: 2021/10/10

Abstract

Background: Changes in the *SET1B* gene expression, can directly affect the incidence and progression of cancer. The gene encoding lncRNA *LIMT* is transcribed as antisense in the opposite direction to *SET1B*. The aim of this study was to investigate the expression of lncRNA *LIMT* and *SETD1B* in tumor tissues compared to adjacent normal in colorectal cancer and the relation between these two genes is related to the clinical features of tumor tissues.

Materials and methods: After collecting 40 tumor and adjacent normal tissues, Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Then the expression levels of the desired genes in tumor and normal tissues was compared. Finally, the obtained results were statistically analyzed by Prism software.

Results: The expression level of *SETD1B* increased 1.8 fold changes in tumor samples ($p = 0.01103$) while the expression level of lncRNA *LIMT* in tumor tissue did not change significantly compared to normal tissue ($p = 0.5391$). In addition, the expression levels of *SET1B* and lncRNA *LIMT* in the two age groups over 60 years and under 60 years in tumor tissues did not change significantly. ROC analysis also showed that *SETD1B* with AUC = 0.336 and CI = 0.8771 - 0.9902 can separate the patient population from the healthy and can help diagnose colorectal cancer.

Conclusion: According to the results of this study, it can be said that *SETD1B* is increased in tumor tissue and can be used as a biomarker for colorectal cancer.

***Corresponding Author:** Maryam Peymani

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Tel: 09132007650

E-mail: m.peymani@iaushk.ac.ir

Keywords: Colorectal cancer, lncRNA *LIMT*, ROC curve *SETD1B* gene.

How to cite this article: Kargar H., Peymani M., Evaluation of Changes in the Expression of SETD1B and Lncrna LIMT Genes in Colorectal Tumor Tissues Compared to Healthy Tissues, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2022; 29(3):318-329.

Introduction

Colorectal cancer is the third most common cancer in men and women worldwide. Statistics show that the prevalence of this disease is increasing in our country and is considered as one of the most important cancers in both sexes. Factors that increase the risk of colorectal cancer include aging, inflammatory bowel disease including ulcerative colitis, a history of adenoma or colon cancer, familial polyposis syndromes, a history of endometrial and ovarian breast cancer, He pointed out the lack of dietary fiber, high levels of unsaturated animal fats and unsaturated vegetable oils. Circulating long noncoding RNAs are a group of circulating RNAs in serum and blood plasma, abbreviated to lncRNAs. This family of circulating RNAs has several functions, including signaling and molecular inhibition, and acts as a scaffold for molecular structures and a guide for ribonucleoprotein complexes. Recent studies have shown that inadequate expression or dysfunction of lncRNAs is involved in the development of many diseases such as AIDS, Alzheimer's, various cancers and other diseases has been found. The study of LINC01089, also known as metastasis inhibitor lncRNA (LIMT), shows that decreased expression of this lncRNA reduces the survival and progression of breast cancer. Therefore, the study of the function of this lncRNA in various cancers can be of particular importance. Examination of the structure and position of this lncRNA shows that the gene associated with this lncRNA is one of the non-coding genes in the 12q24.31 region of the long arm of chromosome 12 and consists of 6 exons. On the other hand, the study of LIMT lncRNA activity and its stress in cellular processes shows that this lncRNA is closely related to genes involved in DNA replication processes and immune system activity. In addition, recent research has shown that this lncRNA is associated with the PRI signaling pathway. The gene encoding SETD1B is also transcribed antisense in the opposite direction to LIMT. Studies show that changes in the expression of the SET gene family, and in particular the SET1B gene, can directly affect the incidence and progression of colorectal cancer. In addition, the study of the structure and locus of the SET1B gene shows that this gene has 19 exons and is located at the 12q24.31 gene locus. Thus, SET1B gene is closely related to lncRNA LIMT in terms of gene position and this closeness can play a role in the interaction of this gene and lncRNA LIMT. Finally, considering the importance of lncRNA LIMT and

the gene encoding SETD1B, which is adjacent to it and is involved in tumorigenesis and tumor metastasis, the expression of these two genes in different stages of disease progression and comparison of their expression in tumor tissue and Adjacent normal has a special importance.

Methodology

The present study has been approved by the Ethics Committee of the Islamic Azad University, Shahrekord Branch, with the code IR.IAU.SHK.REC.1398.028. The present study is a case-control study in which the tumor tissue of 40 patients with colorectal cancer (from Shahrekord Hospital and a newly operated sample) and healthy clone tissue of each person were sampled and all tissue samples were examined by a pathologist and according to the reported criteria were approved. After surgery, tissue samples were placed in RNA Lateral solution (Behnogen and made in Iran) and transferred to the Biotechnology Research Center of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. The samples were then frozen for 24 hours at 4 ° C and then at -20 ° C. In the present study, TRIzol (Invitrogen made in the USA) was used to extract total RNA according to the protocol, and after extracting the extracted RNA, it was evaluated qualitatively and quantitatively. To remove possible contamination of RNA extracted with genomic DNA, each RNA sample was treated with *DNaseI* enzyme (Sinagen made in Iran) for 30 minutes at 37 ° C and in order to neutralize *DNaseI* enzyme, each sample was treated with 1 µl of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Merck made in Germany) was treated and incubated for 10 minutes at 65 ° C. Finally, the cDNA of each sample was synthesized according to the kit protocol using Yekta Equipment Kit and a random 6-nucleotide primer. It should be noted that in order to study the expression of the desired genes, specific reciprocating primers of each gene were designed by Beacon Designer 8.0 and Oligo7 software and after BLAST on NCBI website, by Pishgam Synthesis. Table 1 shows the sequences of SETD1B, LIMT and GAPDH primers in the RT-qPCR method.

In the present study, Real Time-RT PCR technique (Corbett rotor gene 6000) was used to quantitatively measure the expression level of the desired genes. To perform this technique, SYBR Green (a test device made in Iran) was used and

finally, after calculating ΔCT , the ratio of target gene expression in the target sample (patient) to the control sample (healthy) with the formula $2^{-\Delta CT}$ Was calculated.

GraphPad Prism and Excel software were used to calculate the relative frequency of expression for LIMT and SETD1B nc lncRNA genes in colorectal cancer. T-test was used to evaluate the difference in expression of LIMT lncRNA and SETD1B genes in healthy colorectal cancer patients and One way ANOVA was used to compare the expression of LIMT lncRNA and SETD1B genes in different stages.

Results

Comparison of SETD1B and LncRNA LIMT expression in tumor and healthy tissues

In this study, the expression level of SETD1B showed a significant increase of 1.8 fold changes in tumor samples (p value = 0.0103) while the expression level of LIMT lncRNA in tumor tissue did not change significantly compared to normal tissues (p value = 0.5991) (Figure 1). Also, in order to statistically analyze the results and study the changes in the expression level of these genes in tumor tissues compared to normal tissues, Prism v.8 software was used and Independent-Sample t-test was used to evaluate the significance of the data.

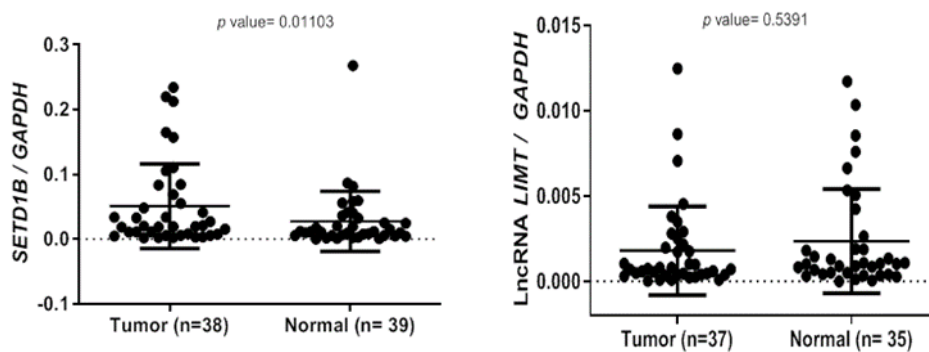


Figure 1. Diagram of change in relative expression level of lncRNA LIMT in tumor and healthy tissues that did not change significantly (p value = 0.591) and b) Diagram of change in relative expression level of SETD1B in tumor tissues compared to healthy had a significant increase (p value = 0.0103).

Comparison of SETD1B and LncRNA LIMT expression in tumor tissues with different stages

In this study, the expression levels of SETD1B and LncRNA LIMT in different stages of the disease in tumor tissues were analyzed using Real

time RT-qPCR technique and ΔCt method. The results showed that the expression level of these genes did not change significantly in different stages of the disease (Figure 2).

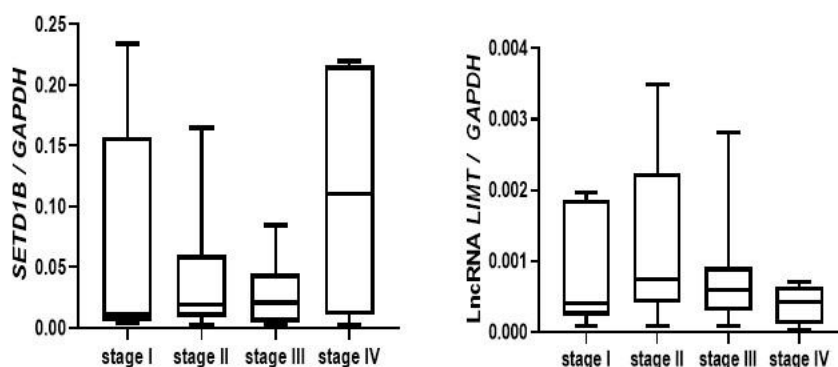


Figure 2. Comparison of SETD1B and LncRNA LIMT expression in different stages of the disease in tumor tissues, the results showed that the expression level of these genes in different stages of the disease did not change significantly.

Comparison of SETD1B and LncRNA LIMT expression in tumor tissues based on age of patients

In this study, the expression levels of SET1B and LncRNA LIMT in two age groups over 60

years and under 60 years in tumor tissues were analyzed using Real time RT-qPCR technique and ΔCt method. The results showed that the expression level of these genes in the two groups did not change significantly (Figure 3).

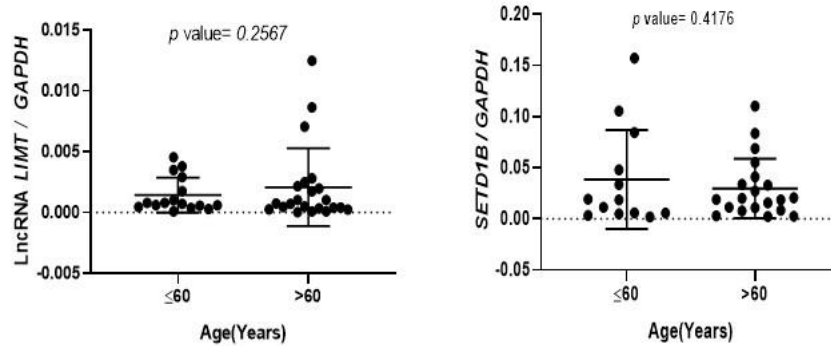


Figure 3. Comparison of SETD1B and LncRNA LIMT expression in tumor tissues based on age of patients, the results showed that the expression level of these genes in the two groups did not change significantly.

Specificity and sensitivity of SETD1B and LncRNA LIMT in colon cancer

In order to evaluate the specificity and sensitivity of each of the genes in this study, ROC test was used to plot the ROC Curve. The results in Figure 4 showed that SETD1B as a marker can significantly (p value <0.0001) can separate the

patient population from the healthy and with an area of the curve (AUC = 0.9336 and CI = 0.8771 / 9902) can help improve the diagnosis of colorectal cancer. However, as shown in Figure 4, LncRNA LIMT with AUC = 0.6134 could not significantly separate the patient population from healthy (p value > 0.05).

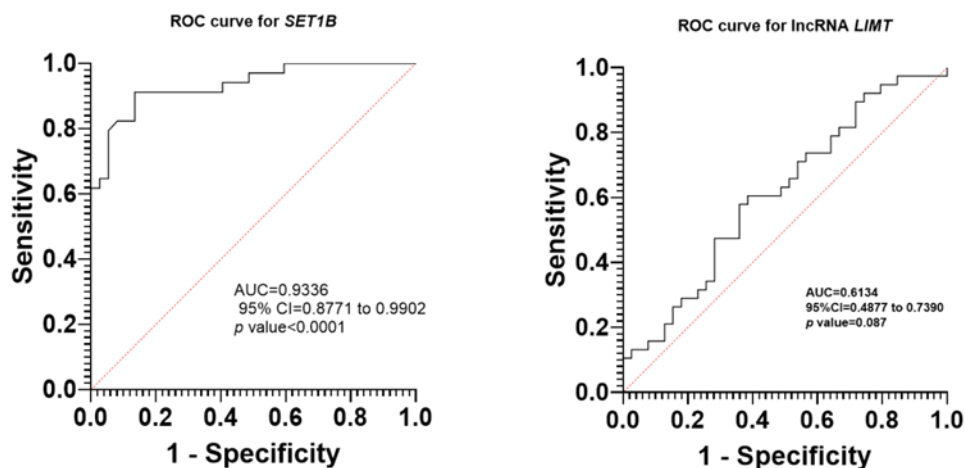


Figure 4. Specificity and sensitivity of LIMT lncRNA and SET1B in colorectal cancer by plotting ROC diagrams, which cannot be used as a predictor to assess the risk of colorectal cancer.

Discussion

High rates of death from CRC have been reported today, but key factors in various aspects of the disease remain unknown. In this study, it was shown that in tumor tissues of CRC compared to normal tissue, the expression of SETD1B gene increased and the expression of LncRNA LIMT did not change significantly. Zhi et al. In 2015 evaluated the association between lncRNA LIMT and brain glioma tumors and the results of this study showed that increased expression of lncRNA LIMT can be considered as a marker for the study of cerebral glioma. Also in 2016, Sas - Chen et al. Examined the association between LIMT lncRNA and breast cancer. Their studies showed that in patients with invasive breast cancer, the expression of this LncRNA is significantly reduced. On the other hand, Li et al. In 2018 examined the role of lncRNA in hepatocellular carcinoma and the results showed that among 59 different lncRNAs, LIMT lncRNA is associated with the treatment process of patients with hepatocellular carcinoma. Increasing its expression improves the treatment process in these patients. In this study, the expression of SETD1B in tumor and normal CRC samples was investigated. The results showed a significant increase in the expression level of this gene in tumor samples compared to healthy samples, although no significant relationship was observed between the expression of this gene in different tumor stages and age groups. In 2019, Chen et al. Expressed the SETD1B gene in carcinoma. They stated that the SET gene (SETD1B) is involved in various biological processes, including tumor growth and development. In addition, analysis of the patient's clinical factors showed that increased expression levels of SETD1B were associated with tumor size, clinical stage, and liver cirrhosis. Patients with HCC showed reduced survival times compared with those with elevated SETD1B expression levels with decreased expression levels of SETD1B. In addition, the results of regression analysis showed that SETD1B modulation is an independent prognostic marker in patients with HCC. The results showed that SETD1B is essential in the progression

of HCC and may be used as a clinical prognostic marker and treatment target in HCC. Also, based on ROC curve for both tumor and healthy populations and calculating the area below this diagram (AUC), it was found that this gene can be considered as a diagnostic marker of CRC, but with increasing the number of samples, more definite comments can be made. In 2019, Chen et al, evaluated the expression of SETD1B in carcinoma. They stated that the SET gene (SETD1B) is involved in various biological processes, including tumor growth and development. In addition, analysis of the patient's clinical factors showed that increased levels of SETD1B expression were associated with tumor size, clinical stage, and liver cirrhosis. One of the major limitations in this study was the lack of proper cooperation between the officials of some hospitals at the beginning of sampling, which made sampling difficult.

Conclusion

Lack of cooperation of some patients due to lack of motivation and lack of hope to improve the conditions and complications of the disease are other limitations of the present study that limited the selection of a larger sample. Finally, according to the results, it is suggested to examine the number of more samples. Evaluation of the function of SETD1B and LncRNA LIMT genes in the development of CRC and also the expression of SETD1B and LncRNA LIMT genes on chemotherapy-resistant samples and the expression of SETD1B and LncRNA LIMT genes in other important cancers and examined the expression of genes in the signaling pathway of SETD1B and LncRNA LIMT genes.

In conclusion, the SETD1B gene could be isolated from the healthy population and could be used as a biomarker for colorectal cancer, but LncRNA LIMT could not be significantly isolated from the healthy population.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

بررسی تغییرات در بیان ژن‌های *SETD1B* و *lncRNA LIMT* در بافت‌های توموری کولورکتال در مقایسه با بافت‌های سالم

هلماه کارگر^۱، مریم پیمانی^{۲*}

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: تغییرات بیان ژن SET1B می‌تواند به صورت مستقیم بر بروز و پیشرفت سرطان تأثیرگذار باشد. ژن کدکننده lncRNA LIMT به صورت آنتی-سنس و در جهت مخالف SET1B رونوشت‌برداری می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی بیان lncRNA LIMT و SETD1B در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های سالم مجاور در بیماران سرطان کولورکتال و ارتباط این دو ژن با ویژگی‌های کلینیکی بافت‌های توموری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از جمع‌آوری ۴۰ بافت توموری و نرمال مجاور، استخراج Total RNA و سنتز cDNA صورت گرفت و سپس سطح بیان ژن‌های موردنظر در بافت‌های توموری و نرمال مقایسه شد. در نهایت نتایج به دست آمده به وسیله نرم‌افزار Prism تحلیل آماری شد.

یافته‌ها: سطح بیان SETD1B به طور معنی‌داری در نمونه‌های توموری به میزان ۱/۸ برابر افزایش نشان داد (p=۰/۱۱۰۳) در حالی که سطح بیان lncRNA LIMT در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال، تغییر چشم‌گیری نداشت (p=۰/۵۳۹۱). به علاوه سطح بیان SET1B و lncRNA LIMT در دو گروه سنی بالای ۶۰ سال و پایین‌تر از ۶۰ سال در بافت‌های توموری تغییر معنی‌داری نداشت. همچنین تحلیل ROC نشان داد که SETD1B با مساحت زیر سطح نمودار AUC=۰/۹۳۳۶ و CI=۰/۸۷۷۱-۰/۹۹۰۲ می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و می‌تواند به تشخیص بیماری سرطان کولورکتال کمک کند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت SETD1B در بافت توموری افزایش می‌یابد و می‌تواند به عنوان یک بیومارکر برای سرطان کولورکتال مورد استفاده قرار گیرد.

* نویسنده مسئول: مریم پیمانی
نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد
تلفن: ۰۹۱۳۲۰۰۷۶۵۰
رایانامه: m.peymani@iaushk.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-5075-5661
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-9387-795X

کلیدواژه‌ها:

ژن SETD1B، lncRNA LIMT، سرطان کولورکتال، نمودار ROC

۱. مقدمه

تشخیص به موقع و پیش‌بینی پیامد این سرطان بسیار با اهمیت می‌باشد و می‌تواند به درمان و بقای بیماران کمک کند [۲]. از عوامل افزایش میزان بدخیمی‌های سرطان کولورکتال می‌توان به بالا رفتن سن، بیماری‌های التهابی روده از جمله کولیت اولسروز^۱، سابقه آدنوم یا سرطان کولون، سندرم‌های پولیپوز خانوادگی، سابقه سرطان پستان آندومتر و تخمدان، کم بودن فیبر غذایی، زیاد بودن چربی‌های حیوانی غیراشباع و روغن‌های گیاهی غیراشباع اشاره کرد [۳].

سرطان روده بزرگ، سومین سرطان شایع در سراسر جهان در مردان و زنان است. آمارها نشان می‌دهد شیوع این بیماری در کشور ما رو به افزایش است و به عنوان یکی از مهم‌ترین سرطان‌ها در هر دو جنس مطرح می‌باشد [۱]. به علاوه در ایران براساس آمار وزارت بهداشت، سرطان کولون، چهارمین سرطان شایع کشور در هر دو جنس است که ۸/۱۲ درصد کل سرطان‌ها را دربرمی‌گیرد.

1 Ulcerative colitis

Copyright © 2022 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 ۳، مرداد و شهریور ۱۴۰۱، ص ۳۲۹-۳۱۸
آدرس سایت: <http://jsms.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

مختلف پیشرفت بیماری و مقایسه بیان آن‌ها در بافت توموری و نرمال مجاور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1398.028 به تصویب رسیده است. تحقیق حاضر از نوع مورد-شاهدی است که از بافت توموری ۴۰ فرد مبتلا به سرطان کلورکتال (از بیمارستان شهرکرد و نمونه تازه جراحی‌شده) و بافت سالم کلون هر شخص، نمونه‌گیری انجام شد و همه نمونه‌های بافتی توسط پاتولوژیست، بررسی و طبق معیارهای گزارش‌شده، تأیید شدند. نمونه‌های بافت پس از جراحی درون محلول RNA Lateral (بهنون و ساخت کشور ایران) قرار داده شد و به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه و سپس در دمای ۲۰- درجه فریز شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در تحقیق حاضر برای استخراج RNA تام از ترايزول (Invitrogen) ساخت کشور آمریکا) مطابق پروتکل استفاده شد و پس از استخراج، RNA استخراج‌شده از لحاظ کیفی و کمی بررسی شد. برای حذف آلودگی احتمالی RNA استخراج‌شده به DNA ژنومی، هر نمونه RNA استخراج‌شده با آنزیم DNaseI (سیناژن ساخت کشور ایران) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد و به‌منظور خنثی‌سازی آنزیم DNaseI هر نمونه با ۱ میکرولیتر اتیلن دی‌آمین تتراسیتیک اسید (EDTA مرک ساخت کشور آلمان) تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما و پرایمر ۶ نوکلئوتیدی تصادفی، طبق پروتکل کیت، cDNA هر نمونه سنتز شد. شایان ذکر است که به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های موردنظر، پرایمرهای رفت و برگشت اختصاصی هر ژن توسط نرم‌افزار BeaconDesigner 8.0 [۱۴، ۱۵] و Oligo7 [۱۶، ۱۷] طراحی شد و پس از BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، توسط شرکت پیشگام سنتز شد. در جدول ۱ توالی آغازگرهای SETD1B، LIMT و GAPDH در روش RT-qPCR آورده شده است.

RNAهای طویل غیرکدشونده^۱، دسته‌ای از RNAهای گردشی موجود در سرم و پلاسمای خون می‌باشند که به اختصار lncRNA خوانده می‌شوند. این خانواده از RNAهای گردشی، دارای عملکردهای متعددی از جمله سیگنال‌رسانی و مهار مولکولی می‌باشد و به‌عنوان داربست برای ساختمان‌های مولکولی و راهنما برای کمپلکس‌های ریبونوکلوپروتئینی فعالیت می‌کند [۴، ۵]. مطالعات اخیر نشان داده است که بیان نشدن صحیح یا عملکرد ناصحیح RNAهای طویل غیرکدشونده، در توسعه و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها مثل ایدز، آلزایمر، انواع سرطان‌ها و دیگر بیماری‌ها نقش دارند و تاکنون بیماری‌هایی مرتبط با بیان نشدن یا عملکرد صحیح RNAهای طویل غیرکدشونده یافت شده است [۸-۶]. بررسی LINC01089 که با نام lncRNA مهارکننده متاستازی (LIMT) نیز شناخته می‌شود نشان می‌دهد که کاهش بیان این lncRNA موجب کاهش احتمال بقا و پیشرفت بیماری سرطان سینه می‌گردد [۹]. بنابراین بررسی عملکرد این lncRNA در سرطان‌های مختلف می‌تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشد. بررسی ساختار و جایگاه این lncRNA نشان می‌دهد که ژن مرتبط با این lncRNA از جمله ژن‌های غیرکدکننده در ناحیه 12q24.31 بازوی بلند کروموزوم ۱۲ می‌باشد و از ۶ اگزون تشکیل شده است [۱۰]. از سوی دیگر بررسی فعالیت LIMT lncRNA و تنش آن در فرایندهای سلولی نشان می‌دهد که این lncRNA با ژن‌های درگیر در فرایندهای تکثیر DNA و فعالیت سیستم ایمنی، ارتباط تنگاتنگی دارد. همچنین تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که این lncRNA با مسیر سیگنالی PRI ارتباط دارد [۱۱].

ژن کدکننده SETD1B نیز به‌صورت آنتی‌سنس و در جهت مخالف LIMT رونوشت برداری می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد تغییرات بیان خانواده ژنی SET و به‌صورت خاص ژن SET1B می‌تواند به‌صورت مستقیم بر بروز و پیشرفت سرطان کولورکتال تأثیرگذار باشد [۱۲]. همچنین بررسی ساختار و جایگاه ژنی SET1B نشان می‌دهد این ژن دارای ۱۹ اگزون و در جایگاه ژنی 12q24.31 قرار دارد. بنابراین ژن SET1B ارتباط نزدیکی از لحاظ جایگاه ژنی با LIMT lncRNA دارد و این نزدیکی می‌تواند در برهم‌کنش این ژن و LIMT lncRNA نقش داشته باشد [۱۳].

در نهایت با توجه به اهمیت LIMT lncRNA و ژن کدکننده SETD1B که در مجاور آن می‌باشد و در فرایندهای تومورزایی و متاستاز توموری نقش دارد، بررسی بیان این دو ژن در مراحل

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده. آغازگرهای *SETD1B*، *LIMIT* و *GAPDH* به همراه طول محصول و دمای آن‌ها در روش RT-qPCR

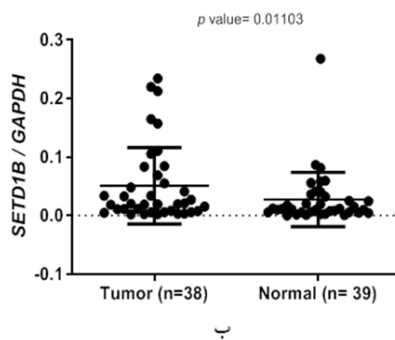
پرایمر	توالی پرایمر ۵' به ۳'	دمای اتصال (°C)	Tm برای هر پرایمر	سایز محصول (bp)
<i>SETD1B</i> Forward	5'-TCAAGATATGTGTGCGAGTCA-3'	۵۶	۵/۵۶	۱۷۴
<i>SETD1B</i> Reverse	5'-TATGGATGATGGAGTCTACC-3'		۵۲/۹۹	
<i>LIMIT</i> Forward	5'-TGGGTTGCTCTGCTTCTGTC-3'		۶۰/۲۵	
<i>LIMIT</i> Reverse	5'-ACCTCTTCAGTTCTGGGGT-3'	۶۰	۶۰/۱۰	۱۳۱
<i>GAPDH</i> Forward	5'-CCACTCCTCCACCTTTGACG-3'		۶۰/۳۲	
<i>GAPDH</i> Reverse	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	۶۰	۵۹/۱۵	۱۲۱

ژن‌های موردنظر در این پژوهش از آزمون Spearman استفاده شد و به منظور بررسی اختصاصیت و حساسیت هر یک از ژن‌های موردنظر در این مطالعه، از آزمون ROC برای ترسیم ROC Curve استفاده شد.

۳. یافته‌ها

بررسی و مقایسه بیان *SETD1B* و *lncRNA LIMT* در بافت‌های توموری و سالم

در این مطالعه، سطح بیان *SETD1B* به طور معنی‌داری در نمونه‌های توموری به میزان ۱/۸ برابر افزایش نشان داد ($p \text{ value} = 0.01103$) در حالی که سطح بیان *lncRNA LIMT* در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال، تغییر چشمگیری نداشت ($p \text{ value} = 0.5391$) (شکل ۱). همچنین به منظور تحلیل آماری نتایج و بررسی تغییرات سطح بیان این ژن‌ها در بافت‌های توموری در مقایسه با بافت‌های سالم، از نرم‌افزار Prism v.8 استفاده گردید و از آزمون Independent-Sample t-test برای بررسی میزان معنی‌داری داده‌ها استفاده شد.

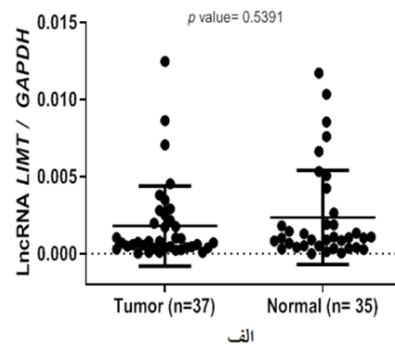


روش Real time RT-PCR

در پژوهش حاضر از روش Real Time -RT PCR (دستگاه Corbett rotor gene 6000) به منظور سنجش کمی سطح بیان ژن‌های موردنظر استفاده شد. برای انجام این تکنیک از SYBR Green (یکتاتجهیز آزما ساخت کشور ایران) استفاده شد و در نهایت پس از محاسبه ΔCT نسبت بیان ژن هدف در نمونه موردنظر (بیمار) نسبت به نمونه کنترل (سالم) با فرمول $2^{-\Delta CT}$ محاسبه شد [۱۸، ۱۹].

تحلیل‌های آماری

میزان فراوانی نسبی بیان برای ژن‌های *lncRNA LIMT* و *SETD1B* در سرطان کولورکتال با نرم‌افزارهای GraphPad Prism و Excel محاسبه شد و پس از تأیید نرمال بودن حجم نمونه با آزمون Shapiro برای بررسی اختلاف بیان ژن‌های *lncRNA LIMT* و *SETD1B* در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال و سالم از آزمون T-test استفاده شد. برای مقایسه بیان ژن‌های *lncRNA LIMT* و *SETD1B* در stage مختلف از آزمون one way ANOVA استفاده شد. همچنین برای بررسی همبستگی بیان

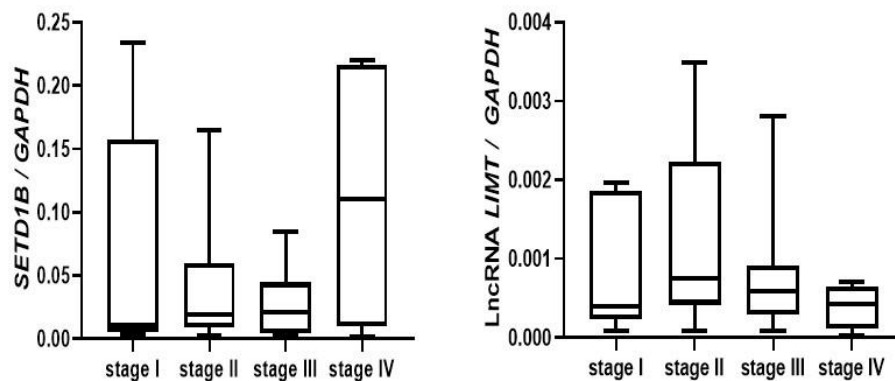


شکل ۱. الف) نمودار تغییر سطح بیان نسبی *lncRNA LIMT* در بافت‌های توموری و سالم که تغییر چشمگیری نداشت ($p \text{ value} = 0.5391$) و ب) نمودار تغییر سطح بیان نسبی *SETD1B* در بافت‌های توموری نسبت به سالم افزایش معناداری داشت ($p \text{ value} = 0.01103$).

بررسی و مقایسه بیان SETD1B و LncRNA LIMT در بافت‌های توموری با stageهای مختلف

در این مطالعه، سطح بیان SETD1B و LncRNA LIMT در stageهای مختلف بیماری در بافت‌های توموری با استفاده از روش Real time RT-qPCR و با استفاده از روش ΔCt تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که سطح بیان این ژن‌ها در stageهای مختلف بیماری، تغییر معنی‌داری ندارد (شکل ۲).

سپس به منظور بررسی همبستگی بیان ژن SETD1B و LncRNA LIMT توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro Wilk بررسی شد و با مشاهده $p \text{ value} < 0.05$ مشخص گردید که توزیع داده‌ها به صورت نرمال نمی‌باشد؛ بنابراین با آزمون Spearman، همبستگی این دو ژن ارزیابی شد. نتایج نشان داد که این دو ژن در بافت توموری، همبستگی مثبت دارند ($r = 0.1840$) اما این همبستگی بیانی، معنی‌دار نمی‌باشد ($p \text{ value} > 0.05$).

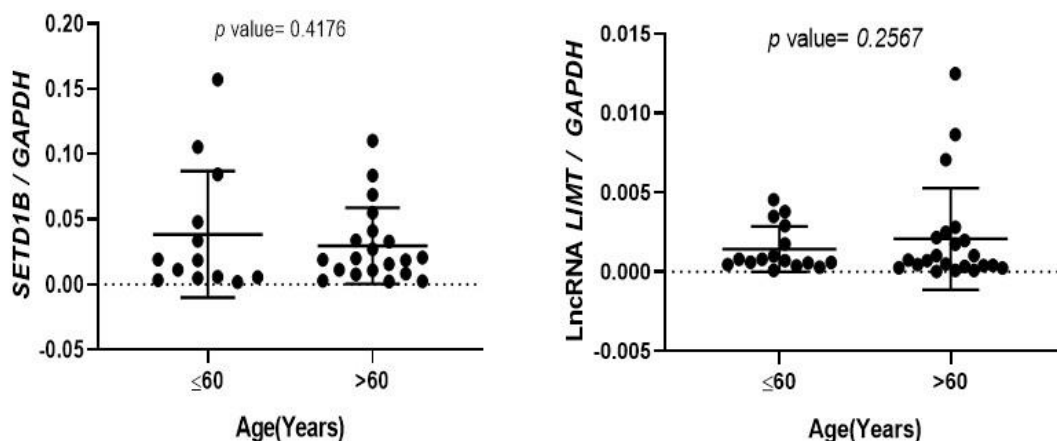


شکل ۲. مقایسه بیان SETD1B و LncRNA LIMT در Stageهای مختلف بیماری در بافت‌های توموری

توموری با استفاده از روش Real time RT-qPCR و با استفاده از روش ΔCt تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که سطح بیان این ژن‌ها در دو گروه مورد بررسی تغییر معنی‌داری ندارد (شکل ۳).

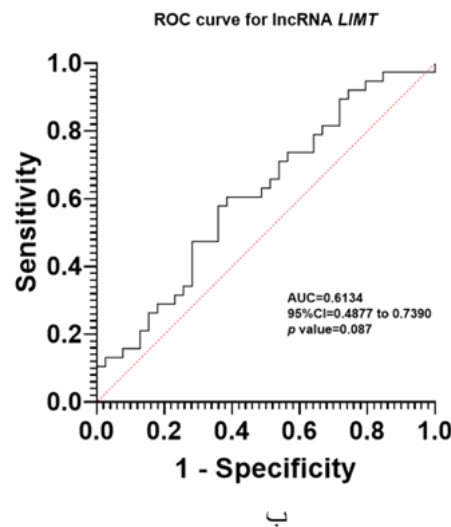
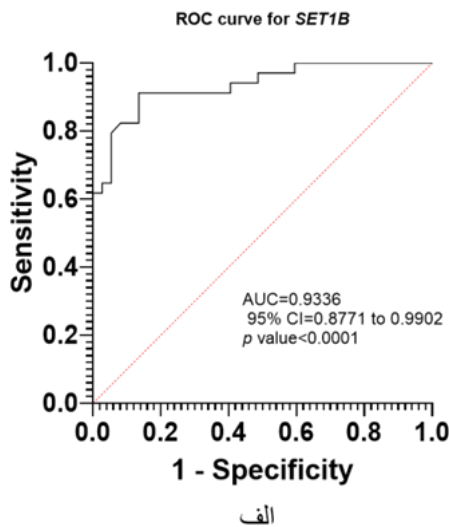
بررسی و مقایسه بیان SETD1B و LncRNA LIMT در بافت‌های توموری براساس سن افراد بیمار

در این مطالعه، سطح بیان SETD1B و LncRNA LIMT در دو گروه سنی بالای ۶۰ سال و پایین‌تر از ۶۰ سال در بافت‌های



شکل ۳. مقایسه بیان SETD1B و LncRNA LIMT در بافت‌های توموری براساس سن افراد بیمار

می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و با مساحت زیر سطح نمودار $AUC=0.9336$ و $CI=0.8771$ تا 0.9902 می‌تواند به بهبود تشخیص بیماری سرطان کلورکتال کمک کند. اما همان‌طور که در شکل ۴ قسمت ب نمایش داده شده است *lncRNA LIMT* با $AUC=0.6134$ نمی‌تواند به‌طور معنی‌داری جمعیت بیمار را از سالم جدا کند ($p \text{ value} > 0.05$).



شکل ۴. الف) اختصاصیت و حساسیت *lncRNA LIMT* در سرطان روده با رسم نمودار ROC که نمی‌تواند به‌عنوان یک عامل پیشگویی‌کننده برای ارزیابی احتمال بروز سرطان کلورکتال نقش ایفا کند. ب) اختصاصیت و حساسیت *SET1B* در سرطان روده با رسم نمودار ROC که می‌تواند به‌عنوان یک عامل پیشگویی‌کننده برای ارزیابی احتمال بروز سرطان کلورکتال نقش ایفا کند.

معناداری کاهش می‌یابد [۹]. از سوی دیگر Li و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی نقش *lncRNA* در کارسینومای هیپاتوسلولار پرداختند و نتایج حاصل نشان داد که از میان ۵۹ *lncRNA* مختلف *lncRNA LIMT* با فرایند درمان بیماران مبتلا به کارسینومای هیپاتوسلولار ارتباط دارد؛ به‌طوری که افزایش بیان آن موجب بهبود روند درمان در این بیماران می‌گردد [۱۱]. در مطالعه حاضر سعی بر بررسی میزان بیان *lncRNA LIMT* در نمونه‌های توموری سرطان کلورکتال در مقایسه با بافت سالم مجاور شده است با استناد به نتایج به‌دست‌آمده میزان بیان این *lncRNA* به‌صورت معناداری تغییر پیدا نکرده است اما ممکن است با افزایش تعداد نمونه‌های موردبررسی، ارتباط معناداری بین میزان بیان این *lncRNA* در نمونه‌های توموری و سالم مشاهده کرد. همچنین مقایسه میزان بیان این *lncRNA* در استیج‌های مختلف تومور و نیز گروه‌های مختلف سنی ارتباط معنی‌داری را نشان نداد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

امروزه نرخ بالایی از مرگ‌ومیر در سرطان کلورکتال گزارش شده است ولی هنوز عوامل کلیدی در جنبه‌های مختلف این بیماری ناشناخته مانده‌اند. در این مطالعه نشان داده شد که در بافت‌های توموری مبتلایان به سرطان کلورکتال در مقایسه با بافت سالم، بیان ژن *SET1B* افزایش و بیان *lncRNA LIMT* تغییر چشمگیری نداشت. در این راستا به توضیح برخی از این تحقیقات می‌پردازیم. Zhi و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی ارتباط *lncRNA LIMT* و تومورهای گلیومای مغزی پرداختند و نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش بیان *lncRNA LIMT* می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای بررسی ابتلا به گلیومای مغزی در نظر گرفته شود [۲۰]. همچنین Sas-Chen و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی ارتباط *lncRNA LIMT* و سرطان سینه پرداختند. مطالعات آن‌ها نشان داد که در بیماران مبتلا به سرطان سینه تهاجمی، میزان بیان این *lncRNA* به‌صورت

برخی از بیماران به علت کمبود انگیزه و امید نداشتن به بهبود شرایط و عوارض بیماری از محدودیت‌های دیگر تحقیق حاضر است که انتخاب نمونه بزرگ‌تر را محدود کرد. در نهایت با توجه به نتایج پیشنهاد می‌شود تعداد نمونه‌های بیشتری بررسی شود. عملکرد ژن‌های *SETD1B* و *LncRNA LIMT* در پیشرفت سرطان کولورکتال بررسی شود و بیان ژن‌های *SETD1B* و *LncRNA LIMT* نیز روی نمونه‌های مقاوم به شیمی‌درمانی و بیان ژن‌های *SETD1B* و *LncRNA LIMT* در سرطان‌های مهم دیگر و بیان ژن‌های موجود در مسیر سیگنالینگ ژن‌های *SETD1B* و *LncRNA LIMT* بررسی گردد.

در پژوهش حاضر ژن *SETD1B* می‌تواند جمعیت بیمار را از سالم جدا کند و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر برای سرطان کولورکتال مورد استفاده قرار گیرد اما *LncRNA LIMT* نمی‌تواند به‌طور معنی‌داری جمعیت بیمار را از سالم جدا کند.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه مصوب کد ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۷۲۰۲۱ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است. بنابر اظهار نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد و تحت حمایت معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد می‌باشد. نویسندگان از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های خون در این پژوهش یاری رساندند، بسیار سپاسگزارند.

Reference

- [1]. Sadat KF, Nazemalhosseini-ME, Forouzesh F. A quantitative investigation of the Bid gene expression in biopsies from colorectal adenomas. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*. 2018;76(2):120-128.
- [2]. Setareh S, Zahiri Esfahani M, Zare Bandamiri M, Raeesi A, Abbasi R. Using Data Mining for Survival Prediction in Patients with Colon Cancer. *Iranian Journal of Epidemiology*. 2018;14(1):19-29.
- [3]. Nahas CSR, Nahas SC, Ribeiro-Junior U, et al. Prognostic factors affecting outcomes in multivisceral en bloc resection for colorectal cancer. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017;72(5):258-264.
- [4]. Akbari F, Peymani M, Salehzadeh A, Ghaedi K. Integrative in silico and in vitro transcriptomics analysis revealed new lncRNAs related to intrinsic apoptotic genes in colorectal cancer. *Cancer Cell Int*. 2020;20(1):546-550.
- [5]. Amir-Shahkarami M, Peymani M. The expression patterns of NBAT1 and CASC15 are associated with colorectal cancer. *Gene Reports*, 2020; 21(2):1-10.
- [6]. Esmaili M, Keshani M, Vakilian M, Esmaili M, Peymani M, Seyed Forootan F, et al. Role of non-coding RNAs as novel biomarkers for detection of colorectal cancer progression through interaction with the cell signaling pathways. *Gene*. 2020;753:144796.
- [7]. Sparber P, Filatova A, Khantemirova M, Skoblov M. The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of hereditary diseases. *BMC Med Genomics*. 2019 Mar 13;12(Suppl 2):42.
- [8]. Chen G, Wang Z, Wang D, Qiu C, Liu M, Chen X, et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic acids research*. 2012;41(D1):D983-D6.
- [9]. Sas-Chen A, Aure MR, Leibovich L, Carvalho S, Erika Y, Körner C, et al. LIMT is a novel metastasis inhibiting lncRNA suppressed by EGF and downregulated in aggressive breast cancer. *EMBO molecular medicine*. 2016;3(23):24-30. e201606198.
- [10]. Wang F, Yang Q. Long Non-Coding RNA LINC01089 Enhances the Development of Gastric Cancer by Sponging miR-145-5p to Mediate SOX9 Expression. *Onco Targets Ther*. 2020;13:9213-9224.

- [11]. Li Y, McGrail DJ, Xu J, Li J, Liu NN, Sun M, et al. MERIT: Systematic analysis and characterization of Mutational Effect on RNA Interactome Topology. *Hepatology*. 2018;5(9):45-50.
- [12]. Choi YJ, Oh HR, Choi MR, Gwak M, An CH, Chung YJ, et al. Frameshift mutation of a histone methylation-related gene SETD1B and its regional heterogeneity in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability. *Human pathology*. 2014;45(8):1674-81.
- [13]. Lee J-H, Tate CM, You J-S, Skalnik DG. Identification and characterization of the human Set1B histone H3-Lys4 methyltransferase complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(18):13419-28.
- [14]. Thornton B, Basu C. Rapid and simple method of qPCR primer design. *PCR Primer Design*: Springer. 2015;4(5):173-9.
- [15]. Singh G, Vajpayee P, Rani N, Amoah ID, Stenström TA, Shanker R. Exploring the potential reservoirs of non specific TEM beta lactamase (blaTEM) gene in the Indo-Gangetic region: a risk assessment approach to predict health hazards. *Journal of hazardous materials*. 2016;314(9):121-8.
- [16]. Rychlik W. OLIGO 7 primer analysis software. *PCR primer design*: Springer. 2007;7(87):35-59.
- [17]. Rahimi Z, Salehi M, Dousti A. CCL2 Polymorphism in Drug-Resistant and Drug-Responsive Patients with Epilepsy in Isfahan, Iran. *Medical Laboratory Journal*. 2017;11(3):30-4.
- [18]. Chen C, Tan R, Wong L, Fekete R, Halsey J. Quantitation of microRNAs by real-time RT-qPCR. *PCR protocols*: Springer; 2011;6(4):113-34.
- [19]. Sedlak RH, Nguyen T, Palileo I, Jerome KR, Kuypers J. Superiority of digital reverse transcription-PCR (RT-PCR) over real-time RT-PCR for quantitation of highly divergent human rhinoviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(2):442-9.
- [20]. Zhi F, Wang Q, Xue L, Shao N, Wang R, Deng D, et al. The use of three long non-coding RNAs as potential prognostic indicators of astrocytoma. *PloS one*. 2015;10(8):e0135242.
- [21]. Chen D, Li T, Wang C, Lei G, Wang R, Wang Z, et al. High-level SETD1B gene expression is associated with unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Molecular medicine reports*. 2019;19(3):1587-94.