مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

ارزیابی بیان ژن *lncRNA ANRIL(CDKN2B-AS1)* در مبتلایان بیماری‌های التهابی روده

فریبا رشید[۱]، غلامرضا جوادی[۱]، حمید اسدزاده عقدایی[۲*]

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی پایه و مولکولی اختلالات گوارشی، موسسه تحقیقات گوارش و بیماری های کبدی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۶

***نویسنده مسئول:** حمید اسدزاده عقدایی، مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی پایه و مولکولی اختلالات گوارشی، موسسه تحقیقات گوارش و بیماری‌های کبدی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۲۲۴۳۲۵۲۸

پست الکترونیک:

hamid.assadzadeh@gmail.com

چکیده

مقدمه

بیماری‌های التهابی روده سبب التهاب مزمن و عودکننده‌ی دستگاه گوارش می‌شوند و به دو بیماری کرون و کولیت اولسراتیو تقسیم‌بندی می‌گردند. در این مطالعه به‌منظور دست‌یابی به بیومارکری برای تشخیص و پیش‌آگهی بیماری‌های التهابی روده، بیان ژن *lncRNA ANRIL (CDKN2B-AS1)* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه شامل ۳۳ بیمار مبتلا به بیماری‌های التهابی روده و ۲۰ فرد سالم است که به پژوهشکده کبد و گوارش دانشگاه شهید بهشتی مراجعه کرده بودند. RNA از نمونه‌های بافتی استخراج‌شده و cDNA آن‌ها ساخته شد. تکثیر ژن‌ها با هدف اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR کمی صورت گرفت و داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Rest تجزیه‌وتحلیل شدند. داده‌های حاصل از مقایسه بافت‌های بیمار و سالم از طریق آنالیز Student's t-test و One-way ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه هردو بیماری کرون و کولیت بر اساس تمامی مشخصات بیماری که التهاب را نیز شامل می‌شد موردبررسی قرار گرفتند و اختلاف معناداری در میان بیماران کرون و کولیت در مقایسه با افراد کنترل مشاهده نگردید (P=۰/۱۳۴۰). در بررسی میزان بیان *lncRNA ANRIL* در دو جنس زن و مرد نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P=۰/۲۵۷۱).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که نمی‌توان از *lncRNA ANRIL* به عنوان بیومارکری جهت تشخیص و تمیز بیماری‌های التهابی روده در جامعه ایرانی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها

بیماری‌های التهابی روده، lncRNA ANRIL(CDKN2B-AS1)، بیماری کرون، کولیت اولسراتیو

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

مقدمه

بیماری‌های التهابی روده[1] اصطلاحی عمومی برای گروهی از اختلالات التهابی مزمن و عودکننده دستگاه گوارش است که می‌تواند هر بخشی از دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار دهد (۱). بیماری کرون[2] و کولیت اولسراتیو[3] اشکال عمده IBD ایدیوپاتیک می‌باشند (۳,۲). بیماری کرون می‌تواند هر بخشی از دستگاه گوارش (از دهان تا مقعد) را تحت تأثیر قرار دهد درحالیکه کولیت اولسراتیو عمدتاً محدود به کولون و رکتوم است و بسته به نوع وسعت و شدت التهاب به انواع مختلفی تقسیم‌بندی می‌شود(۴). کولیت اولسراتیو معمولاً درونی‌ترین لایه روده بزرگ و مقعد را درگیر می‌کند. این حالت به‌واسطه کشش‌های مداوم در کولون اتفاق می‌افتد، درست برعکس کرون که در مقطع‌های زمانی کوتاه و در هر قسمتی از مجرای گوارش رخ می‌دهد و معمولاً به بافت‌های عمیق بخش‌های درگیر در مجرای گوارش نیز نفوذ می‌کند (۱و۴). بیماری‌های التهابی روده در کشورهای پیشرفته شایع هستند و شیوع آن‌ها در کشورهای درحال‌توسعه در حال افزایش است بطوریکه یک نفر از هر ۲۰۰ نفر را با بروز در حال افزایش تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). با این وجود تا به امروز درمان‌های پزشکی هم چنان به تسکین علائم از طریق بهبود التهاب ادامه می‌دهند و درمان قطعی برای این بیماری‌ها وجود ندارد (۶).

مطالعات نشان داده‌اند که بیماری‌زایی در بیماری‌های التهابی روده به‌صورت تعاملی از استعداد ژنتیکی، شرایط محیطی خود بیمار (سیگار کشیدن، استرس، داروها، تغذیه با شیر مادر و...)، ایمنی مخاطی و میکروفلور روده است و این حوزه‌های ریسک به احتمال زیاد مستقل نیستند و به‌طور قابل‌توجهی بر یکدیگر تأثیر می‌گذارند (۷و۸). به مرور پدیده اپی‌ژنتیک با نیاز به شناسایی مکانیسم‌هایی که موجب اثرگذاری فاکتورهای محیطی شده و سبب ایجاد و حفظ التهاب روده‌ای مزمن می‌شوند، مطرح گردید.

مهم‌ترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی عبارتند از: متیلاسیون DNA[4]، تغییرات هیستونی[5] و RNA های غیرکدکننده[6] (۹). شواهد نشان می‌دهند که بیشتر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک کنترل بیان ژن، از طریق RNA های غیرکدکننده از قبیل میکروRNA ها[7]، RNA های کوچک [8] و RNA های طویل[9] صورت می‌گیرند. ncRNA ها قادرند متیلاسیون سیتوزین و تغییرات هیستونی را که مربوط به تنظیم بیان ژن در ارگانیسم‌های پیچیده و در میان برخی دیگر از عملکردهای غیر مرتبط هستند را هدایت کنند (۱۰).

lncRNA ها با طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید، از طریق آنزیم RNA پلیمرازII رونویسی می‌شوند و دارای اثرات اپی‌ژنتیکی سازگار با یک ژن رونویسی شونده هستند.

---

[1] Inflammatory Bowel Disease: IBD
[2] Crohn's Disease: CD
[3] Ulcerative Colitis: UC
[4] DNA Methylation
[5] Histone Modification
[6] ncRNAs
[7] Micro RNAs
[8] Small ncRNAs: sncRNAs
[9] Long non coding RNAs: lncRNA

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

این RNA های غیر کد شونده گروه جدیدی از ژن‌های شناخته‌شده در ژنوم هسته‌ای انسان هستند که از بخش وسیعی از ژنوم یوکاریوت‌ها رونویسی شده‌اند (۱۱). شواهدی وجود دارد که lncRNA ها به‌طور مستقیم در تنظیم بسیاری از فرآیندهای طبیعی سلول نقش دارند و کاهش یا افزایش بیان آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها در ارتباط هستند (۱۲). تشخیص بالقوه lncRNA های مرتبط با بیماری‌های انسانی می‌تواند نه تنها درک مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌ها را در سطح lncRNA ها تسریع کند، بلکه بیومارکری برای تشخیص، درمان و پیش‌آگهی بیماری‌های انسانی نیز به‌حساب می‌آید به عنوان مثال*lncRNA UCA1* یک بیومارکر برای تشخیص سرطان مثانه به کار می‌رود (۱۲). زمانی که نقش بیماری‌زای میکرو RNAها به‌طور گسترده‌ای در بیماری‌های التهابی روده موردبررسی قرارگرفته بود، مطالعات انگشت‌شماری بر روی نقش lncRNA ها متمرکز بودند (۱۳و۱۴). عملکرد دقیق lncRNA ها در بیماری‌های دستگاه گوارش هنوز به‌طور کامل شناخته‌نشده است با این وجود مطالعات اخیر نشان می دهند که نقش حیاتی را در آبشار التهابی، تنظیم عملکرد سیستم ایمنی و پیشرفت بیماری‌های مرتبط با خود ایمنی مانند بیماری کرون و کولیت اولسراتیو ایفا می کنند (۱۵و ۱۶)، که ازجمله آن‌ها می‌توان به قدرت lncRNA ها در تنظیم ژن‌های کد کننده پروتئین در سطح بازسازی کروماتین، کنترل رونویسی و فرآیندهای پس از رونویسی اشاره کرد (۱۶).

در مطالعه‌ای که توسط میرزا و همکارانش در سال ۲۰۱۵ انجام شد اختلال در تنظیم[۱] بیان ژن‌های کدکننده پروتئین و lncRNA ها در هردوی بیماری کرون و کولیت اولسراتیو نشان داده شد (۱۵).

پس از آن در مطالعه‌ای جدید، غربالگری ژنوم حدود lncRNA،۱۷۰۰۰ صورت گرفت و در این میان lncRNA،۴۵۵ که دارای بیان متفاوت بودند در بیوپسی کلون بیماران کولیت فعال در مقایسه با گروه کنترل سالم، شناسایی شدند و ۱۳ تا از این lncRNA مرتبط با کولیت اولسراتیو فعال در این مطالعه به تائید رسیدند. این مطالعه برای اولین بار lncRNA های مرتبط با بیماری‌های التهابی روده را که توسط محرک‌های التهابی تنظیم می‌شوند و نقش مهمی در عملکرد اپی‌تلیال روده‌ای بازی می‌کنند را شناسایی کرد (۱۷).

lncRNA ANRIL یا *CDKN2B-AS1* به‌عنوان یک مولکول تنظیمی مهم، بیماری‌های انسانی را در سطوح مختلف میانجی‌گری می‌کند (۱۸). میزان بیان این lncRNAدر انواع سرطان‌ها ازجمله سرطان معده(۱۹)، سرطان ریه(۲۰)، کارسینوم هپاتوسلولار(۲۱)، سرطان رحم(۲۲)، سرطان مثانه(۲۳) خون و... از تنظیم خارج‌شده و افزایش‌یافته است (۱۸).

هدف از انجام این مطالعه به‌کارگیری *lncRNA ANRIL* به‌عنوان بیوماکر استعداد ابتلا به بیماری، بیومارکر پیش‌آگهی زودهنگام، بیومارکر تائید و تشخیص بیماری (CD یا UC) و یا بیومارکر پاسخ به درمان است که در نتیجه منجر به کمک به بهبود درمان و تشخیص زودهنگام این بیماری‌ها شده و از تبعات آن‌ها می‌کاهد.

[۱] Dysregulation

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و معیارهای ورود و خروج

این مطالعه مورد - شاهدی بر روی ۳۳ نمونه بیمار مبتلا به بیماری‌های التهابی روده (20UC و 13CD) مراجعه‌کننده به کلینیک گوارش بیمارستان طالقانی و ۲۰ نمونه کنترل سالم بین سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶ انجام گرفت. ابزار مورد استفاده در این مطالعه پرسشنامه و مشاهده آزمایش بود.

بیماران با توجه به معیارهای متعارف تشخیص و میزان بیماری‌های التهابی روده براساس علائم بالینی، آندوسکوپی، رادیولوژی و یافته‌های هیستوپاتولوژیک شناسایی شدند. معیار ورود به گروه بیمار تأیید بیماری‌های التهابی روده با انجام کلونوسکوپی و تأیید پاتولوژی بود.

گروه کنترل از بین افراد مراجعه‌کننده به کلینیک گوارش بیمارستان طالقانی انتخاب شدند و سلامتی این افراد براساس طرح پرسش و معیارهای سالم بودن از لحاظ فیزیکی و جسمی، اجابت مزاج منظم، پرداختن به امور معمول زندگی روزمره و همچنین فقدان بیماری‌های حاد و مزمن به‌ویژه IBD و بیماری‌های التهابی و گوارشی تعریف شد. تمام این موارد با مشورت و پس از تأیید پزشک متخصص و مشاور طرح انجام شد.

ازکلیه افراد واردشده به مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه کتبی دریافت گردید و مطالعه با مجوز کمیته اخلاق مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه شهید بهشتی با کد اخلاق (IR.SBMU.RIGLD.REC.1395.120) به انجام رسید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه‌های بافتی پس از انجام کلونوسکوپی در RNA later قرار داده شدند تا زمانی که RNA آن‌ها استخراج شود. استخراج RNA از طریق AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (KAT.NO.80224) کیاژن آلمان و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. به این ترتیب که اندازه‌ی مشخصی از بافت را هموژن کرده و سپس عصاره همگن حاصل از لیز را به یک Mini spin column قرار داده‌شده در یک 2ml collection tube انتقال دادیم و پس از سانتریفوژ در ماکزیمم سرعت و در دمای محیط ادامه مراحل را نیز با اضافه کردن مقادیر مشخصی از پروتئیناز k، اتانول ۹۶-۱۰۰ و بافرهای موجود در کیت به انجام رساندیم.

کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه نانودراپ N1000 سنجیده شد. در ادامه RNA استخراج‌شده برای انجام مرحله‌ی نسخه‌برداری معکوس و ساخت cDNA توسط کیت Thermo Scientific RevertAid RT Kit #K1691 و در دو مرحله طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورداستفاده قرار گرفت. به این ترتیب که total RNA، Random hexamer primer و آب RNase free را به مقدار مشخص در یک تیوب استریل نوکلئاز free میکس کرده در ^{o}C ۶۵ برای مدت ۵ دقیقه آن را انکوبه کردیم و در مرحله‌ی بعد یک مخلوط از Reaction buffer، Ribolock RNase inhibitor، dNTP و RivertAid RT را به میکروتیوب

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

اضافه کرده و در ۲۵ °c و به دنبال آن ۶۰ دقیقه در °c ۴۲ انکوبه کردیم.

طراحی پرایمر

پرایمرهای مربوط به ژن ANRIL با نرم‌افزار Gene Runner طراحی و در بخش primer Blast سایت NCBI به‌منظور اطمینان از محل اتصال جفت پرایمرها چک شدند. سپس توالی پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد (جدول ۱). برای ارزیابی صحت و کارکرد درست پرایمرها ابتدا به کمک تکنیک PCR و با توجه به دما (TM) پرایمرها، گرادیان دمایی برای اپتیمایز آن‌ها در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌ها برای انجام مراحل PCR و طی کردن چرخه‌های دمایی لازم برای تکثیر قطعه ژنومی موردنظر، در دستگاه ترموسایکلر (Authorized Thermo cycler Eppendorf) قرار گرفتند.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	GC%	دمای ذوب °C
ANRIL Forward	5´GCCTCATTCTGATTCAACAGC3´	۲۱	۴۷/۶۲	۵۷/۵۸
ANRIL Reverse	5´GATCTCCCCGGTTTTCTTCT3´	۲۰	۵۰	۵۶/۹۲
B2M Forward	5´TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT3´	۲۵	۴۰	۶۰/۳
B2M Reverse	5´TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT3´	۲۲	۵۴/۵۵	۶۱/۹۸

بررسی بیان ژن *ANRIL*

تکثیر ژن با هدف اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR کمی (qRT-PCR) و با استفاده از دستگاه Rotator gene QIAGEN و BioFact™ 2X Real-Time PCR Smart mix Sybergreeen صورت گرفت. ژن مرجع در این مطالعه ژن بتا ۲ میکروگلوبولین بود که برای اطمینان از مفاهیم آماری، هر نمونه در هر پلیت به‌صورت Duplicate گذاشته شد. اجزای واکنش Real time PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که مقادیر هر یک از اجزای واکنش عبارت است از: ۱۰ میکرولیتر مستر سایبر گرین بایوفکت، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۱ میکرولیتر نمونه، ۷ میکرولیتر آب نوکلئاز free.

رسم منحنی ذوب توسط دستگاه روتاتور صورت گرفته و داده‌های خام به صورت Ct از دستگاه استخراج شدند. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر ژن ANRIL مطابق جدول ۲ می‌باشد.

آنالیز آماری

به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزار Prism و SPSS استفاده شد و داده‌ها به صورت انحراف معیار±میانگین بیان شدند. آنالیز Real-time توسط نرم‌افزار LinReg PCR نرمال‌سازی شده و سپس توسط نرم‌افزار Relative Expression Software Tool معنی-داری داده‌ها در سطح $P<۰/۰۵$ مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های حاصل از مقایسه بافت‌های بیمار و سالم از

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

طریق آنالیز Student's t-test و One-way ANOVA ارزیابی شد.

جدول ۲- برنامه حرارتی تکثیر ژن ANRIL

3-step cycling protocol			
مرحله	دما	زمان	تکرار
مرحله ۱(دناتوراسیون)	۹۵	۱۵ دقیقه	۱
مرحله ۲(PCR)	۹۵	۲۰ ثانیه	۴۰
	۶۴	۴۰ ثانیه	
	۷۲	۴۰ ثانیه	
مرحله ۳		Melt Curve	

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۳ فرد مبتلا به بیماری‌های التهابی روده که به‌منظور غربالگری در خلال سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ به پژوهشکده گوارش و کبد شهید بهشتی تهران مراجعه و تحت کولونوسکوپی قرارگرفته بودند و ۲۰ کنترل سالم موردبررسی قرار گرفتند. همه افراد از نژاد ایرانی انتخاب شدند و افراد غیر ایرانی اعم از افغانی و دیگر نژادها، از مطالعه خارج گردیدند. برای ارزیابی سن به‌عنوان یک صفت کمی از آزمون غیر پارامتریک من ویتنی[۱] و برای جنسیت به‌عنوان یک صفت کیفی از آزمون مربع کای ۲[۲] استفاده شد. میانگین± انحراف معیار BMI[۳] افراد موردمطالعه عبارت است از ۲۲/۶۲±۰/۸۷ و میانگین± انحراف معیار سن افراد مورد مطالعه ۳۳/۴۰±۲/۴۴ می‌باشد. اطلاعات دموگرافیک بیماران و فراوانی آن‌ها در جدول ۳ قابل مشاهده است.

[۱] Mann-Whithney
[۲] Chi-squared test
[۳] Body mass index

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

جدول ۳- اطلاعات دموگرافیک بیماران و فراوانی آن‌ها

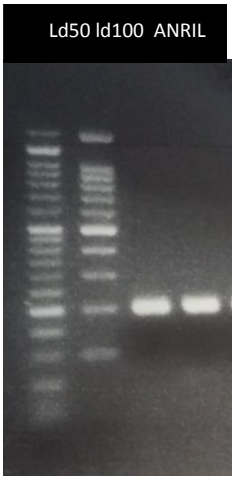
متغیر			فراوانی (درصد)
نوع IBD	UC		۲۰(۶۰/۶)
	CD		۱۳(۳۹/۴)
فاز IBD	Active		۲۵(۸۹/۳)
	inactive		۳(۱۰/۷)
جنسیت	IBD	مرد	۱۵(۴۶/۹)
		زن	۱۷(۵۳/۱)
	کنترل	مرد	۹(۴۵/۰)
		زن	۱۱(۵۵/۰)
سن افراد موردمطالعه	IBD		۳۳/۴۰ ± ۲/۴۴
	کنترل		۵۵/۰۰±۱۲/۷۳۲
BMI افراد موردمطالعه	IBD		۲۲/۶۲۷±۴/۸۹۲
	کنترل		۲۶/۳۳۸±۴/۲۶۳
داروها	Mezalazine	Yes	۱۴(۴۶/۷)
		NO	۱۶(۵۳/۳)
	Mesalamine(Asacol)	Yes	۷(۲۵/۰)
		NO	۲۱(۷۵/۰)
	Metronidazole	Yes	۸(۲۸/۶)
		NO	۲۰(۷۱/۴)
	Azathioprine	Yes	۷(۲۴/۱)
		NO	۲۲(۷۵/۹)

نتایج سنجش کمیت و کیفیت RNA های استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ حاکی از خلوص بالای آن‌ها و عدم وجود هرگونه آلودگی اعم از پروتئین، بافر و... بود.

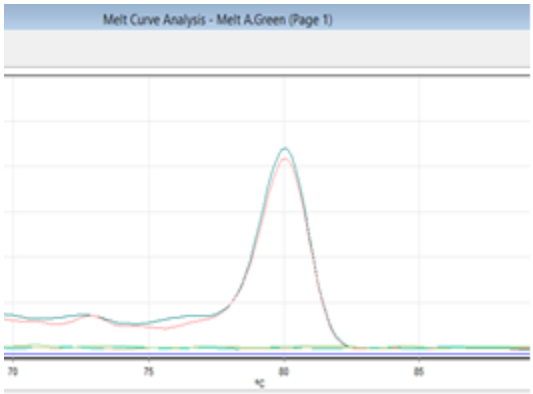
محصول PCR ژن اختصاصی *ANRIL* بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تنها یک باند اختصاصی را نشان داد (شکل ۱)، همچنین وجود منحنی ذوب تک قله‌ای برای این ژن

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

(شکل ۲)، تأییدکننده اختصاصی بودن نتایج PCR بر روی نمونه‌های مورد بررسی بود.



شکل ۱- باند اختصاصی ژن *ANRIL* بر روی ژل آگارز

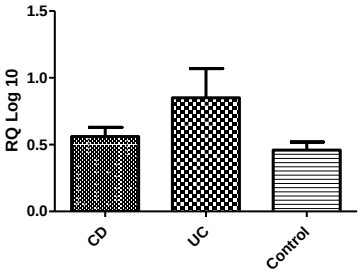


شکل ۲- منحنی ذوب مربوط به ژن *ANRIL* lncRNA

پس از اطمینان از بهینه‌سازی شرایط واکنش، واکنش‌های Real time PCR برای همه نمونه انجام‌شده و منحنی‌های تکثیر و ذوب مورد بررسی قرار گرفتند.

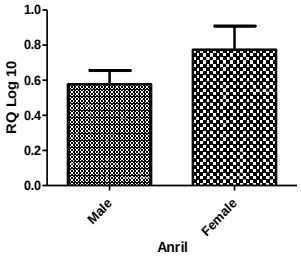
در مقایسه بیان ژن *ANRIL* بین سه گروه CD، UC و کنترل در بیماری‌های التهابی روده که با تست One-way ANOVA صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019



نمودار ۱- مقایسه بیان ژن *ANRIL* بین سه گروه CD، UC و کنترل در بیماری‌های التهابی روده (*P*=۰/۱۳۴۰)

در مقایسه بیان ژن *ANRIL* بین دو جنس زن و مرد که از طریق t-test صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه بیان ژن *ANRIL* در دو جنس زن و مرد در بیماری‌های التهابی روده (*P*=۰/۲۵۷۱)

بحث

بیماری التهابی روده یک بیماری خود ایمنی است که مجموعه‌ای از عوامل ژنتیکی، فاکتورهای محیطی و فلور طبیعی روده در ایجاد آن دخیل هستند (۲۴). در دهه‌های گذشته، راهی برای تشخیص زودهنگام این بیماری وجود نداشت، همچنین در حال حاضر درمان قطعی جهت بهبود کامل این بیماری، شناخته نشده است. با تمام این تفاسیر امروزه محققان با مطالعات فراوان و انجام آزمایشات متعدد به یکسری مواد قابل اندازه‌گیری مشتق شده از نمونه‌های بافت تحت عنوان بیومارکرها دست یافته‌اند. بررسی اثرات متقابل اجزا و عناصر مختلف مانند بیومارکرها و سایتوکاین ها در مسیر ایمن‌سازی، امروزه روش‌های جدید تشخیص و پیش‌آگهی را تقویت کرده و پنل درمانی را برای بیماری‌های التهابی روده فراهم کرده اند. شناسایی بیومارکرها به‌عنوان روش‌های غیر تهاجمی، سودمند و مقرون به‌صرفه می‌تواند رویکرد درمانی مؤثری در بیماری‌های التهابی روده به شمار آید (۲۵). از جمله بیومارکرهای نوینی که در بیماری‌های التهابی روده مورد بررسی قرارگرفته‌اند، ncRNA ها هستند که از آن‌ها می‌توان به lncRNA ها اشاره کرد.*lncRNA ANRIL*

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

طولی حدود ۳/۸ kb دارد و حاوی ۱۹ اگزون با ۳۸۵۷ نوکلئوتید است (۲۶).

در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای توسط پوتولاکیس[۱] و همکارانش بر روی *lncRNA ANRIL* صورت گرفت که نمایانگر کاهش بیان این lncRNA در بیماران کولیت اولسراتیو (*P*=۰/۰۰۰۹) و کرون (*P*=۰/۰۴۱) در مقایسه با گروه کنترل بود، این در حالی است که با بررسی تغییرات بیان ژن حاضر، مطالعه ما اختلاف معنی‌داری بین سه گروه کولیت اولسراتیو و کرون و کنترل نشان نداد (*P*=۰/۱۳۴۰) (۲۷).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط میرزا و همکارانش صورت گرفت، پروفایل ترنسکریپتومی ژن‌های *lncRNA* و ژن‌های کدکننده پروتئین از بیوپسی روده بیماران مبتلا به بیماری‌های التهابی روده با استفاده از یک پلت فرم ریزآرایه‌ی بیانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها اختلال در تنظیم بیان ژن‌های کدکننده پروتئین و *lncRNA* ها در هردوی بیماری کرون و کولیت اولسراتیو را نشان داد. به‌طور قابل‌توجهی اثرات ترنسکریپتومیک متفاوت*lncRNA* ها و ژن‌های کدکننده پروتئین در بیماری کرون ملتهب (iCD) و کولیت اولسراتیو ملتهب (iUC) طبقه‌بندی واضحی از فنوتیپ بیماری کرون و کولیت فراهم کرد. این داده‌ها نشان می‌دهد که *lncRNA* ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای پیش‌بینی کننده بیماری‌های التهابی روده استفاده شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که *lncRNA ANRIL* در هردوی iCD و iUC در مقایسه با کرون و کولیت غیر التهابی و کنترل‌های سالم بیان کاهش‌یافته‌ای داشتند (*P*<۰/۰۰۱)(۱۵). در این مطالعه بیماران براساس فاکتور التهاب مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز داده‌های ما بیانگر اختلاف معنی‌دار میان بیماران کرون و کولیت در مقایسه با افراد کنترل نبود (*P*=۰/۱۳۴۰) .

یکی از دلایل مغایرت نتایج ما با دیگر مطالعات نحوه مصرف و نوع داروهای مصرفی توسط بیماران، مراحل مختلف بیماری (فاز فعال یا غیرفعال)، هتروژنیتی متفاوت جمعیت، عوامل محیطی(جغرافیا، رژیم غذایی و...) و... می‌باشد.

قابل ذکر است که اخیراً شیوع بالای بیماری‌های مرتبط با ایمنی در زنان به اثبات رسیده است و این تمایل جنسیتی می‌تواند از متوسط تا شدید با اثرات متفاوتی از جنسیت بر شدت بیماری تأثیرگذار باشد (۲۸). آنالیزهایی که تا به امروز به انجام رسیده‌اند ارتباط تمایل جنسیتی لوکوس‌های IBD را تأیید کردند (۲۸). همچنین امروزه تأثیر جنسیت بر روی ایمنی به خوبی شرح داده شده است و عمدتاً دلیل آن تأثیر هورمون‌های جنسی و ژن‌های پاسخ ایمنی مرتبط با جنس است (۲۹). طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط علی خواه و همکارانش برروی بیماری CAD[۲](نوعی بیماری التهابی) انجام شد، تأثیر هورمون‌های جنسی بر روی بیان *lnc-DC* نشان داده شد، به‌گونه‌ای که این lncRNA تنها در خانم‌ها تفاوت بیان داشت (۳۰). از آنجایی که تأثیر هورمون‌های جنسی بر میکروبیوم روده و نقش lncRNA ها در IBD به اثبات رسیده است (۳۱). از این

[۱] Pothoulakis

[۲] Coronary artery disease

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

رو بررسی بیان *lncRNA ANRIL* در دوجنس زن و مرد مورد توجه قرار گرفت و تاثیر آن برروی جنسیت بررسی شد. با توجه به آنالیز داده های ما اختلاف معنی‌داری در میزان بیان این lncRNA را در ارتباط با جنسیت مشاهده نشد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به محدودیت‌های آزمایشگاهی، تعداد نمونه و ... اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

با تکیه‌بر مطالعات انگشت‌شماری که ارتباط lncRNA ها را با بیماری‌های التهابی روده بررسی کرده‌اند محققان بیان متغییر lncRNA ها را در بیماری کرون و کولیت اولسراتیو به اثبات رساندند (۱۵). طبق مطالعات صورت گرفته ژن *ANRIL* ایزوفرم‌های متفاوتی دارد که بیان مختص بافت دارند. همچنین یکسری از مطالعات که در بیماری ملانوما بر روی این ژن صورت گرفت مبین این امر بوده‌اند که هر ۱۹ اگزون رونوشت‌های *ANRIL* بیان متفاوتی دارند (۳۲). ما نیز در روند set up این ژن به این مهم واقف شدیم و پیشنهاد می‌کنیم که ایزوفرم های مختلف *lncRNA ANRIL* در بیماری‌های التهابی روده نیز مورد بررسی قرار گیرند.

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان می دهد که نمی‌توان از *lncRNA ANRIL* به‌عنوان بیومارکری جهت تشخیص و تمییز بیماری‌های التهابی روده در جامعه ایرانی استفاده کرد.

References

1. Xavier R, Podolsky D. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2007;448(7152):427-34.
2. Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. Microbes Infect 2017;19(3):210-21.
3. Van Limbergen J, Radford-Smith G ,Satsangi J. Advances in IBD genetics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014;11(6):372-85.
4. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, *et al*. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes :a genetic association study. Lancet 2016;387(10014):156-67.
5. Molodecky NA, Soon S, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, *et al*. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 2012;142(1):46-54. e42.
6. Fulforth JM, Gearry RB. Inflammatory bowel disease risk and the environment: Where to next? Journal of gastroenterology and hepatology 2016;31(6):1074-5.
7. Gearry RB. IBD and environment: are there differences between east and west. Dig Dis 2016;34(1-2):84-9.
8. Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. Clin Epidemiol 2013;5:237-47.
9. Kellermayer R. Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases. Can J Gastroenterol 2012;26(12):909-15.
10. Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. Gene 2008;410(1):9-17.
11. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S ,Tilgner H, *et al*. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. Genome Res 2012;22(9):1775-89.
12. 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 Res 2012;41:D983-6.
13. Edgington-Mitchell LE. Long noncoding RNAs: novel links to inflammatory bowel disease?. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2016;311(3):G444-5.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 21:11 IRDT on Sunday May 19th 2019

14. Noori-Daloii MR, Eshaghkhani Y. lncRNAs: significance and function mechanisms. MEDICAL SCIENCES 2015;25(2):79-94. [Persian]
15. Mirza AH, Berthelsen CH, Seemann SE, Pan X, Frederiksen KS, Vilien M, *et al*. Transcriptomic landscape of lncRNAs in inflammatory bowel disease. Genome Med 2015;7(1):39.
16. Chen D, Liu J, Zhao H-Y, Chen Y-P, Xiang Z, Jin X. Plasma long noncoding RNA expression profile identified by microarray in patients with Crohn's disease. World J Gastroenterol 2016;22(19):4716-31.
17. Wu F, Huang Y, Dong F, Kwon JH . Ulcerative colitis-associated long noncoding RNA, BC012900, regulates intestinal epithelial cell apoptosis. Inflamm Bowel Dis 2016;22(4):782-95.
18. Deng W, Wang J, Zhang J, Cai J, Bai Z, Zhang Z. TET2 regulates LncRNA-ANRIL expression and inhibits the growth of human gastric cancer cells. IUBMB life 2016;68(5):355-64.
19. Zhang D, Sun G, Zhang H, Tian J, Li Y. Long non-coding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of cervical cancer and promotes carcinogenesis via PI3K/AKT pathways. Biomed Pharmacother 2017;85:511-6.
20. Nie F-q, Sun M, Yang J-s, Xie M, Xu T-p, Xia R, *et al*. Long noncoding RNA ANRIL promotes non–small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. Mol Cancer Ther 2015;14(1):268-77.
21. Huang M-d, Chen W-m, Qi F-z, Xia R, Sun M, Xu T-p, *et al*. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2. J Hematol Oncol 2015;8:1-14.
22. Naemura M, Murasaki C, Inoue Y, Okamoto H, Kotake Y. Long noncoding RNA ANRIL regulates proliferation of non-small cell lung cancer and cervical cancer cells. Anticancer Res 2015;35(10):5377-82.
23. Zhu H, Li X, Song Y, Zhang P ,Xiao Y, Xing Y. Long non-coding RNA ANRIL is up-regulated in bladder cancer and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through the intrinsic pathway. Biochem Biophys Res Commun 2015;467(2):223-8.
24. Jenke AC ,Zilbauer M. Epigenetics in inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol 2012;28(6):577-84.
25. Norouzinia M, Chaleshi V, Alizadeh AHM, Zali MR. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: insight into diagnosis, prognosis and treatment .Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2017;10(3):155.
26. Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health. Int J Mol Sci 2013;14(1):1278-92.
27. Pothoulakis C, Iliopoulos D, Rankin R, Padua D. P-307 The Long Non-coding RNA, CDKN2B-AS1, Is Associated with IBD and Is Downregulated by TGF-beta. Inflammatory Bowel Diseases 2017;23:S98.
28. Khrom M, Potdar AA, Mengesha E, Li D, Targan SR, McGovern D, *et al*. 592 Gender-Stratified Analyses Identifies Sex-Specific IBD Associations. Gastroenterology 2018;154(6):S-125-S-6.
29. Vemuri R, Sylvia KE, Klein SL, Forster SC, Plebanski M, Eri R, *et al*. The microgenderome revealed: sex differences in bidirectional interactions between the microbiota, hormones, immunity and disease susceptibility. Semin Immunopathol 2018.
30. Alikhah A, Kakhki MP, Ahmadi A, Dehghanzad R, Boroumand MA, Behmanesh M. The role of lnc-DC long non-coding RNA and SOCS1 in the regulation of STAT3 in coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Complications 2018;32(3):258-65.
31. Insenser M, Murri M, del Campo R, Martínez-García MÁ, Fernández-Durán E, Escobar-Morreale HF. Gut Microbiota and the Polycystic Ovary Syndrome: Influence of Sex, Sex Hormones, and Obesity. J Clin Endocrinol Metab 2018;103(7):2552-62.
32. Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. Epigenetics 2015;10(2):103-21.