مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

بررسی میزان بیان LncRNA CRNDE در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان روده بزرگ

ثریا غلامی‌نژاد .M.Sc[۱]، زهرا دیلمی .Ph.D[۱]، علی صالح‌زاده .Ph.D*[۲]، امیر جلالی .Ph.D*[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، زنجان، ایران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، رشت، ایران
۳- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: salehzadeh@iaurasht.ac.ir، a-jalali@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه مقایسه میزان بیان LncRNA CRNDE در نمونه‌های توموری و نرمال افراد مبتلا به سرطان روده بزرگ به‌روش Real Time-PCR بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۰ نمونه از بافت توموری افراد مبتلا به‌سرطان روده بزرگ و ۲۰ نمونه بافت غیرتوموری همان افراد از بانک تومور مجتمع بیمارستانی امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. پس از استخراج RNA کل از بافت‌های سرطانی و نرمال، DNA مکمل سنتز و با استفاده از روش Real Time-PCR سطوح بیان LncRNA CRNDE در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از روش ANOVA یک‌طرفه و تست Tukey استفاده شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده افزایش دو برابری بیان LncRNA CRNDE در هر ۲۰ نمونه سرطان روده بزرگ در مقایسه با نمونه‌های نرمال بود.

نتیجه‌گیری: باتوجه به‌افزایش قابل توجه بیان LncRNA CRNDE در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال، می‌توان از حضور این LncRNA در خون به‌عنوان یک نشان‌گر زیستی برای تشخیص زودرس و غیرتهاجمی، سرطان روده بزرگ استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سرطان روده بزرگ، رونوشت‌های غیرکدکننده طویل، CRNDE، نشانگر زیستی

مقدمه

سرطان شامل مجموعه‌ای از بیماری‌های ژنتیکی است که با رشد و تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌ها و انتشار آن‌ها در بدن همراه است. براساس آخرین آمار جامع منتشر شده توسط سازمان بهداشت جهانی درباره میزان شیوع و مرگ‌ومیر ناشی از انواع سرطان‌ها در سال ۲۰۱۸، سرطان روده بزرگ سومین سرطان شایع (۶/۱ درصد) و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان (۹/۲ درصد) در کل جهان بعد از سرطان ریه است. طبق برآوردهای انجام شده، در سال ۲۰۱۸ بیش از ۱/۸ میلیون نفر به‌سرطان روده بزرگ مبتلا و ۸۸۱ هزار نفر بر اثر آن به‌مرگ دچار شده‌اند (۱). براساس این آمار میزان بروز سرطان روده بزرگ در کشورهای توسعه یافته در مقایسه با کشورهای درحال توسعه مانند ایران، حدود سه‌برابر بیش‌تر است که به‌نظر می‌رسد مهم‌ترین دلیل آن استفاده بیش‌تر این جوامع از غذاهای فرآوری شده و آماده نسبت به غذاهای سنتی باشد.

درک اساس مولکولی سرطان نقش مهمی در شناسایی عوامل موثر در شکل‌گیری تومور و پیشرفت آن داشته و هم‌چنین پاسخ یا مقاومت بافت توموری در برابر عوامل ضدتوموری را تعیین می‌کند. ابتلا به‌سرطان روده بزرگ نتیجه وقوع برهم‌کنش بین مجموعه‌ای از عوامل ارثی، محیطی و فردی است. آشنایی با سرطان روده بزرگ در سطح مولکولی، اطلاعات لازم برای غربال‌گری افراد مستعد ابتلا به اشکال خانوادگی سرطان، امکان شناسایی شناساگرهای پیش‌بینی کننده به‌منظور تشخیص استعداد افراد نسبت به روش‌های درمانی مختلف و هم‌چنین گسترش آزمایش‌های تشخیص مولکولی غیرتهاجمی را فراهم کرده است. شناسایی عوامل مولکولی شرکت کننده در متاستاز سلول‌های سرطانی روده بزرگ می‌تواند نقش مهمی در طراحی و تولید داروهای جدید برای جلوگیری از شکل‌گیری تومور و کنترل پیشرفت بیماری داشته باشد (۲).

RNA ی غیرکدکننده طویل (lncRNAs) رونوشت‌های با طول بیش‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید با عدم‌قابلیت کدکردن پروتئین‌ها هستند که در تنظیم بیان ژن‌ها در سطوح رونویسی و ترجمه و هم‌چنین تغییرات اپی‌ژنتیک نقش‌های مختلفی ایفا می‌کنند (۳). اختلال در عمل‌کرد یا بیان lncRNAها ارتباط نزدیکی با ابتلا به‌انواع بیماری‌ها از جمله سرطان دارد (۴). مشخص شده است که این رونوشت‌های بلند غیرکدکننده که در سرطان‌های مختلف پروفایل‌های منحصر به‌فردی دارند، در مهار مرگ برنامه‌ریزی شده، تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی به‌بافت‌های دیگر شرکت دارند (۵، ۶). lncRNAها مانند سایر قطعات نوکلئیک اسید مرتبط با سرطان که از سلول‌ها خارج شده‌اند، به‌داخل جریان خون بیماران مبتلا به‌سرطان وارد شده و امکان ارزیابی غیرتهاجمی بیان ژن‌ها را فراهم می‌کنند. به‌همین علت از این رونوشت‌های غیرکدکننده می‌توان به‌عنوان نشان‌گر زیستی برای پیش آگهی و تشخیص سرطان استفاده کرد. مطالعات اخیر نشان داده است که بیان lncRNAها در بعضی از تومورهای انسانی ازجمله سرطان روده بزرگ (CRC) به‌میزان زیادی افزایش یافته یا مهار می‌شد (۷).

رونوشت‌های غیرکدکننده CRNDE (colorectal neoplasia differentially expressed) ازجمله lncRNAهای سلول‌های انسان است که ژن کدکننده آن برروی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۶ انسان (16q12.2) قرار گرفته است. نتایج حاصل از تحقیقات گذشته، نشان داده است که CRNDE نقش قابل توجهی در تکثیر، مهاجرت و تهاجم انواع سلول‌های توموری دارد. Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان بیش از اندازه CRNDE در سلول‌های گلیوما را گزارش کردند که نتیجه آن ممکن است تسهیل رشد و مهاجرت این سلول‌ها درشرایط *in vivo* و *in vitro* باشد (۸). همچنین Chen و همکاران (۹) مشاهده کردند که افزایش CRNDE از راه تاثیر منفی برروی تنظیم mirRNA-384 باعث بیان بیش‌تر فاکتور هسته‌ای κB و p پروتئین کیناز B (AKT) و در نتیجه تحریک تکثیر، مهاجرت و تهاجم کارسینوم کبدی می‌شود. Zhu و همکاران (۱۰) به بررسی نقش LncRNA CRNDE برروی تکثیر و تهاجم سلول‌های کارسینوم سلول‌های کبدی در شرایط *in vivo* و *in vitro* پرداختند. آن‌ها در بررسی‌های خود نشان دادند که کاهش بیان CRNDE باعث افزایش بیان پروتئین‌های کادهرین E و ZO-1 و کاهش بیان کادهرین N، slug، twist و vimentin می‌شود که نتیجه آن مهار انتقال اپیتلیال-

مزانشیمی است. نقش CRNDE در شروع و پیشرفت سرطان روده بزرگ نیز توسط محققین مختلف اثبات شده است. در سال ۲۰۱۶، Liu و همکاران (۱۱) گزارش کردند که یک ارتباط معنی‌دار بین افزایش بیان LncRNA CRNDE-h که یکی از اشکال CRNDE است با شکل‌گیری و پیشرفت سرطان روده بزرگ وجود دارد. براساس گزارش Ding و همکاران (۱۲)، غیرفعال کردن این رونوشت غیرکدکننده منجر به‌مهار تکثیر سلول‌های سرطانی روده بزرگ و القای مرگ برنامه‌ریزی شده در آن‌ها در هردو حالت *in vivo* و *in vitro* می‌شد که نتیجه آن کاهش اندازه تومور است.

باوجود پیشرفت در روش‌های تشخیص، بیش از نیمی از بیماران مبتلا به‌سرطان روده بزرگ تسلیم بیماری می‌شوند که دلیل آن تشخیص بیماری در مراحل پیشرفته است. به‌همین دلیل با توجه به‌کمبود روش‌های پیش آگهی و تشخیصی غیرتهاجمی و کم هزینه برای CRC، شناسایی نشانگرهای زیستی جدید و بالقوه موثر در تحقیقات اخیر سرطان توجه بیش‌تری را به‌خود جلب کرده است. با توجه به‌آمار بالای ابتلا و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان روده بزرگ و نقش مهم CRNDE در شکل‌گیری و پیشرفت این سرطان و از آن‌جا که تاکنون تحقیقی برروی ارتباط سطوح بیان CRNDE و استعداد ابتلا به‌سرطان روده بزرگ در جمعیت‌های ایرانی صورت نگرفته، در این تحقیق به‌مطالعه سطح بیان LncRNA CRNDE در یک جمعیت از افراد مبتلا به‌سرطان روده بزرگ پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در این تحقیق به‌منظور بررسی تغییرات بیانی ژن کدکننده LncRNA CRNDE، تعداد ۲۰ نمونه بافت توموری تازه جدا شده از افراد مبتلا به‌مراحل مختلف سرطان روده بزرگ از بانک تومور مجتمع بیمارستانی امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. از بین بیماران انتخاب شده که هیچ‌کدام پیش از آن تحت درمان‌های مختلف مانند شیمی یا پرتو درمانی قرار نگرفته بودند، ۱۰ مورد به‌درجات ۱ و ۲ بیماری و ۱۰ مورد دیگر به‌درجات ۳ و ۴ مبتلا بودند. درکنار هر نمونه توموری، یک نمونه از بافت سالم مجاور فرد بیمار نیز به‌عنوان نمونه کنترل جمع‌آوری شد. تمام افرادی که از نمونه‌های بافت ایشان در این پژوهش استفاده شده، طبق فرم اجازه‌نامه کتبی بیمارستان امام خمینی، رضایت خود را جهت انجام پژوهش اعلام کردند.

بررسی بیان ژن

استخراج RNA: برای استخراج RNA کل سلول از کیت RiboEX (GeneAll Biotechnology RNA extraction kit, South Korea) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای اطمینان از استخراج صحیح RNA، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی و به‌منظور حذف آلودگی‌های DNA، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۲ میکرولیتر آنزیم DNaseI (TaKaRa bio, Japan) تیمار شدند. در پایان برای غیرفعال کردن آنزیم DNaseI، نمونه‌های RNA به‌مدت ۶۰ دقیقه با ۲ میکرولیتر EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) تیمار و کمیت و کیفیت آن‌ها، باروش تعیین دانسیته نوری به‌وسیله دستگاه نانودراپ (Thermo scientific-Nanodrop 2000) تعیین شد.

طراحی آغازگر و سنتز cDNA میزان بیان ژن کدکننده LncRNA CRNDE باروش Real Time-PCR مورد بررسی قرارگرفت. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مورد نیاز جهت سنتز توالی cDNA از نرم‌افزار generunner و برای بررسی اختصاصیت آن‌ها از نرم افزار primer blast در پایگاه داده NCBI استفاده شد (جدول ۱). سنتز cDNA با کیت BioFact (South Korea) انجام شد. برای این منظور به‌وسیله دستگاه نانودراپ غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از هر

نمونه تهیه و cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده سنتز شد. مخلوط واکنش Real Time-PCR با حجم کلی ۲۰ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین (TaKaRa bio, Japan)، ۲ میکرولیتر cDNA (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱۰ پیکومول مخلوط آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۲ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، تهیه و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ۴۰ چرخه، مطابق برنامه زمانی-دمایی جدول ۲ به‌وسیله دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf Master Cycler Gradient, Germany) انجام شد. به‌منظور مقایسه و بررسی درستی بیان ژن هدف، از GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (۱۳). پس از پایان مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، منحنی‌های ذوب بین دماهای ۶۰ تا ۶۴ درجه‌سانتی‌گراد به‌منظور بررسی اختصاصیت واکنش و عدم تشکیل دایمرهای آغازگر رسم شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده

آغازگر	توالی	طول محصول (bp)
CRNDE-F	5'-ACACGGCTTTCCGGAGTAGA-3'	۱۱۸ bp
CRNDE-R	5'-GCCAACATTTGGAGGAACCC-3'	
GAPDH-F	5'-ATGTTGCAACCGGGAAGGAA-3'	۱۵۹ bp
GAPDH-R	5'-AGGAAAAGCATCACCCGGAG-3'	

جدول ۲: برنامه زمانی و دمایی واکنش Real Time-PCR

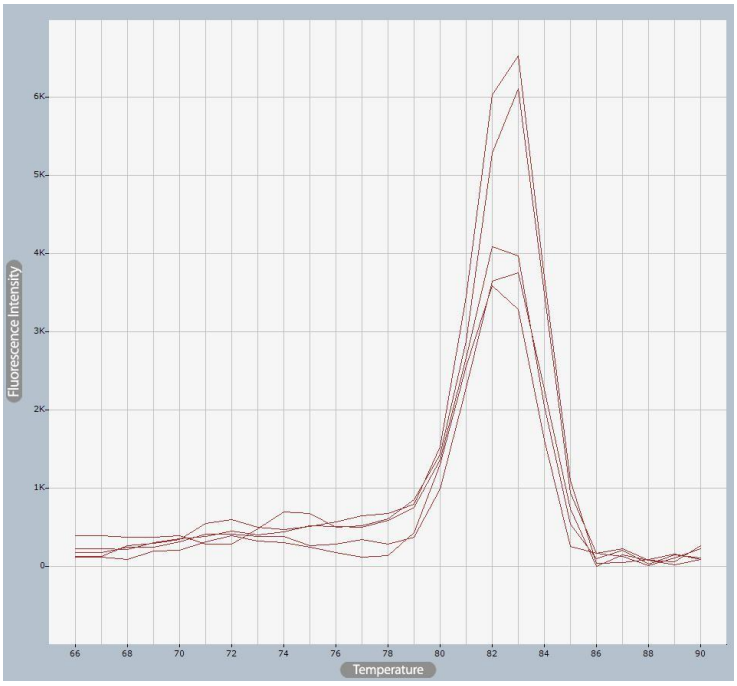
مرحله	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵	۱
واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴	
اتصال مجدد	۳۰ ثانیه	۶۰	۴۰
طویل شدن	۲۰ ثانیه	۷۲	

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده از واکنش Real Time-PCR با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. بیان ژن LncRNA CRNDE در نمونه‌ها باروش Tukey's HSD post-hoc محاسبه و برای بررسی توزیع نرمال بودن داده‌ها از آزمون ANOVA یک‌طرفه استفاده و متوسط متغیرها با استفاده از میانگین±انحراف معیار بیان شد. رسم نمودارها در Excel 2016 انجام شد. هر آزمایش حداقل سه‌بار تکرار و $p<۰/۰۵$ برای سطح اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها درنظر گرفته شد.

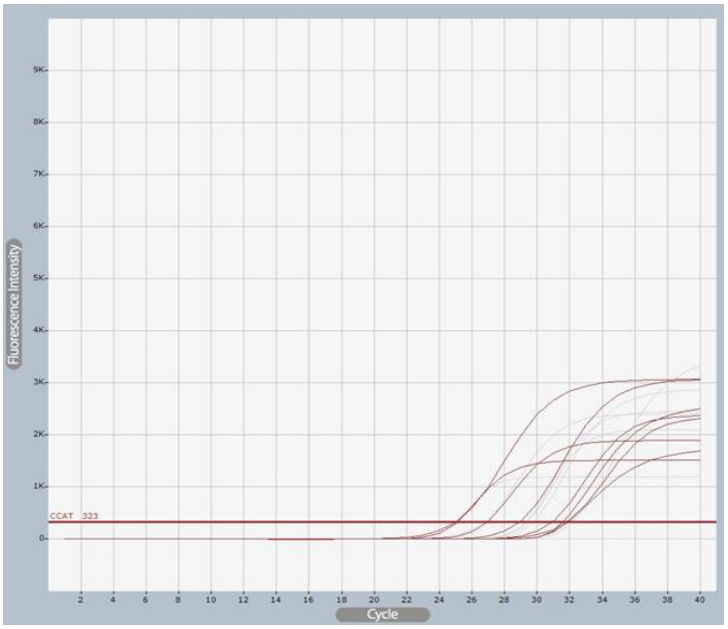
نتایج

در این مطالعه به‌بررسی میزان بیان ژن کدکننده LncRNA CRNDE در ۲۰ نمونه از بافت توموری و ۲۰ نمونه از بافت سالم افراد مبتلا به‌سرطان روده بزرگ، به‌روش Real Time-PCR پرداخته شد. منحنی ذوب رسم شده برای ژن هدف دارای یک قله بود که نشان دهنده تکثیر تنها یک محصول خاص در واکنش PCR است (نمودار ۱).



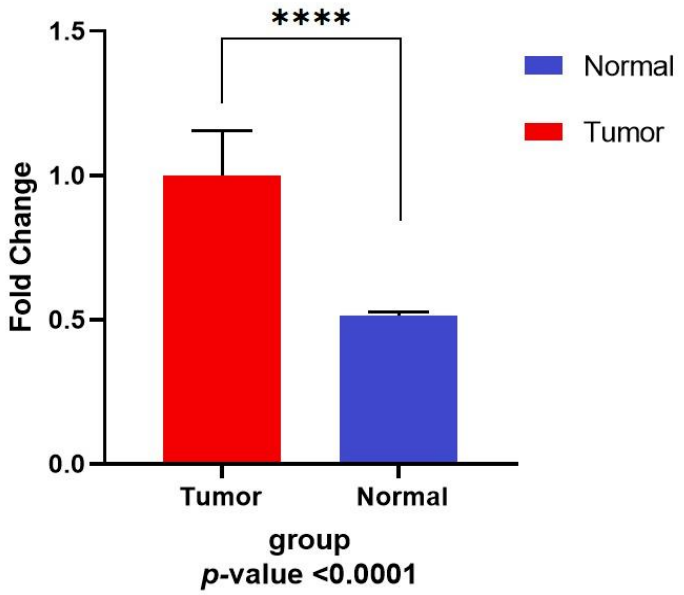
نمودار۱: نمودار منحنی ذوب LncRNA CRNDE با نقطه ذوب ۸۲/۹ درجه‌سانتی‌گراد

در زمان انجام واکنش، دستگاه Real Time-PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر چرخه را به‌صورت یک منحنی تکثیر نشان داد (نمودار ۲)، به‌این ترتیب که با افزایش میزان محصول تولید شده، میزان رنگ متصل شده بین دو رشته DNA بیشتر و در نتیجه میزان نور فلورسنت ساطع شده نیز بیش‌تر خواهد شد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد و یک Ct به‌دست آمد که نشان دهنده چرخه‌ای است که در آن شدت نور فلورسانت ساطع شده از تکثیر محصول به‌حد آستانه رسیده است.



نمودار۲: منحنی تکثیر LncRNA CRNDE

بررسی بیان LncRNA CRNDE در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های نرمال، نشان دهنده افزایش بیان در سلول‌های هر ۰۲ فرد مبتلا به‌سرطان روده بزرگ بود. این افزایش به‌طور میانگین حدود دو برابر و در سطح ۰/۰۰۰۱ معنی‌دار بود (شکل ۱).



شکل۱: مقایسه میانگین بیان ژن LncRNA CRNDE در ۲۰ نمونه توموری و بافت نرمال مجاور آن (p<۰/۰۰۰۱، n=۳)

بحث

RNAهای غیرکدکننده طویل (LncRNAs) گروهی از miRNAها هستند که با هدف قرار دادن توالی‌های غیرکدکننده سمت '۳ ژن‌های هدف خود، بیان آن‌ها را تنظیم می‌کنند (۱۴، ۱۵). مطالعات گذشته نشان داده است که فعالیت حدود ۱۸ درصد از ژن‌های غیرکدکننده lncRNAها با انواع سرطان‌ها مرتبط است، درحالی‌که تنها ۹ درصد از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های انسانی در ارتباط با سرطان‌های مختلف هستند (۱۶). شواهد نشان می‌دهد که تغییر بیان lncRNAها با شکل‌گیری تومور همراه است (۱۷).

در سال های اخیر مشخص شده است که بیان بی‌قاعده بعضی از lncRNAها نقش مهمی در شکل‌گیری و پیشرفت سرطان روده بزرگ ایفا می‌کند. به‌عنوان مثال مشخص شده است که افزایش بیان lncRNAهای CCAT1، MALAT1، PVT-1 و HOTAIR در سلول‌های سرطان روده بزرگ می‌تواند نقش مهمی در شکل‌گیری تومور و متاستاز آن به‌بافت‌های دیگر داشته باشد (۸۱-۱۲). Cui و همکاران (۲۲) نشان دادند که lncRNA HEIH با تغییر عمل‌کرد miR-939/Bcl-xL باعث افزایش تکثیر سلول‌های تومور روده بزرگ می‌شود. Iguchi و همکاران (۲۳) ثابت کردند که lncRNA ATB به‌طور مشخصی با رشد سلول‌های تومور روده بزرگ و رگ‌زایی در بافت سرطانی ارتباط دارد. Xu و همکاران(۲۴) تایید کردند که کاهش سطوح lncRNA SNHG1 در سلول‌های سرطان روده بزرگ، از راه تنظیم miR-154-5p باعث مهار رشد سلول-های سرطانی می‌شد. با این‌حال بیان lncRNAها در سلول‌های سرطان روده بزرگ همواره با افزایش همراه نیست، مطالعات نشان داده است که کاهش بیان lncRNAهای Evf-2 و GAS5 در این سلول‌ها می‌تواند عامل جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی و آغاز مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطان روده بزرگ باشد (۲۵ و ۲۶).

در این مطالعه میزان بیان ژن LncRNA CRNDE در سلول‌های بافت سرطانی و بافت نرمال مجاور آن در ۲۰ فرد مبتلا به‌سرطان روده بزرگ مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان دهنده افزایش معنی‌دار و قابل توجه LncRNA CRNDE در هر ۲۰ فرد مورد مطالعه در بافت توموری نسبت به بافت نرمال بود. این نتایج، تحقیقات Ding و

همکاران (۱۲) که نشان دادند LncRNA CRNDE از طریق مهار بیان DUSP5/CDKN1A باعث تکثیر سلول‌های توموری روده بزرگ می‌شود، را تایید می‌کند. افزایش بیان LncRNA CRNDE و ارتباط آن با تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی و مهار مرگ برنامه‌ریزی شده در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال، Tang و همکاران نشان دادند که این LncRNA از راه افزایش بیان SIX1 در پیشرفت کارسینوم سلول‌های کبدی نقش دارد (۲۷). Zhu و همکاران (۱۰) نشان دادند LncRNA CRNDE با افزایش مسیر سیگنالینگ Wnt/beta-catenin در شکل‌گیری کارسینوم سلول‌های کبدی شرکت می‌کند. آن‌ها هم‌چنین تایید کردند که این LncRNA به‌واسطه miR-136-5P باعث افزایش بیان IRX5 و تحریک تشکیل سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۸). علاوه براین، غیرفعال شدن ژن کدکننده LncRNA CRNDE ممکن است با افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی روده بزرگ در شرایط *in vitro* و *in vivo* همراه باشد (۱۲). Han و همکاران (۲۹) مشاهده کردند که غیرفعال شدن این LncRNA و miR-181a-5p microRNA باعث مهار مسیر سیگنالینگ Wnt/β-catenin و در نتیجه مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و کاهش مقاومت آن‌ها در برابر داروهای شیمی درمانی می‌شد. بنابراین شاید بتوان از آن به‌عنوان یک مارکر پیش آگهی‌دهنده در این سرطان استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

بررسی سطوح بیان LncRNA CRNDE در نمونه‌های توموری و نرمال افراد مبتلا به‌سرطان روده بزرگ با استفاده از روش Real Time-PCR نشان داد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین میزان بیان این LncRNA در دو گروه سلولی وجود دارد. بنابراین شاید بتوان از اندازه‌گیری مقادیر این LncRNA در خون محیطی افراد مستعد یا مشکوک به ابتلا به‌سرطان روده بزرگ به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی برای تشخیص زود هنگام بیماری استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت مرکز تومور بیمارستان امام خمینی تهران به‌دلیل در اختیار گذاشتن نمونه‌های توموری تشکر و قدرانی می‌شود.

منابع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Cancer Journal for Clinicians. 2018; 68(6): 394.
2. Munteanu I, Mastalier B. Genetics of colorectal cancer. Journal of Medicine and Life. 2014; 7(4): 507-511.
3.Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. Nature genetics. 2015; 47(3): 199–208.
4. Jiang MC, Ni JJ, Cui WY, Wang BY, et al. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. American Journal of Cancer Research. 2019; 9(7): 1354-1366.
5. Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. Cell. 2013; 152(6): 1298–1307.
6. Yuan JH, Yang F, Wang F, Ma JZ, et al. A long noncoding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. Cancer Cell. 2014; 25(5): 666–681.
7. Siddiqui H, Al-Ghafari A, Choudhry H, Al Doghaither H. Roles of long non-coding RNAs in colorectal cancer tumorigenesis: A Review. Molecular and Clinical Oncology. 2019; 11(2): 167-172.

8. Wang Y, Wang Y, Li J, Zhang Y, et al. CRNDE, a long-noncoding RNA, promotes glioma cell growth and invasion through mTOR signaling. Cancer Letter. 2015; 367(2): 122–128.
9. Chen Z, Yu C, Zhan L, Pan Y, et al. LncRNA CRNDE promotes hepatic carcinoma cell proliferation, migration and invasion by suppressing miR-384. American Journal of Cancer Research. 2016; 6(10): 2299–2309.
10. Zhu L, Yang N, Du G, Li C, et al. LncRNA CRNDE promotes the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells via enhancing the Wnt/β-catenin signaling pathway. Journal of Cellular Biochemistry. 2018; 120(2): 1156–64.
11. Liu T, Zhang X, Yang YM, Du LT, et al. Increased expression of the long noncoding RNA CRNDE-h indicates a poor prognosis in colorectal cancer, and is positively correlated with IRX5 mRNA expression. OncoTargets and Therapy. 2016; 11(9): 1437–1448.
12. Ding J, Li J, Wang H, Tian Y, et al. Long noncoding RNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation via epigenetically silencing DUSP5/CDKN1A expression. Cell Death and Disease. 2017; 8: e2997.
13. Li DX, Fei XR, Dong YF, Cheng CD, et al. The long non-coding RNA CRNDE acts as a ceRNA and promotes glioma malignancy by preventing miR-136-5p-mediated downregulation of Bcl-2 and Wnt2. Oncotarget. 2017; 8(50): 88163-88178.
14. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes & Development. 2004; 18(5): 504–511.
15. Chen Z, Pan X, Sheng Z, Yan G, et al. Baicalin suppresses the proliferation and migration of Ox-LDL-VSMCs in atherosclerosis through upregulating miR-126-5p. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2019; 42(9): 1517–1523.
16. Khachane AN, Harrison PM. Mining mammalian transcript data for functional long non-coding RNAs. PloS One. 2010; 5(4): e10316.
17. Oliva J, Bardag-Gorce F, French BA, Li J, et al. The regulation of non-coding RNA expression in the liver of mice fed DDC. Experimental and Molecular Pathology. 2009; 87(1): 12–19.
18. Nissan A, Stojadinovic A, Mitrani-Rosenbaum S, Halle D, et al. Colon cancer associated transcript-1: a novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues. International Journal of Cancer. 2012; 130(7): 1598–1606.
19. Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Uchi R, et al. Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via apoptosis inhibition in colorectal cancers. British Journal of Cancer. 2014; 110(1): 164–171.
20. Xue Y, Gu D, Ma G, Zho l, et al. Genetic variants in lncRNA HOTAIR are associated with risk of colorectal cancer. Mutagenesis. 2015; 30(2): 303–310.
21. Zheng HT, Shi DB, Wang YW, Li XX, et al. High expression of lncRNA MALAT1 suggests a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2014; 7(6): 3174–3181.
22. Cui C, Zhai D, Cai L, Duan Q, et al. Long noncoding RNA HEIH promotes colorectal cancer tumorigenesis via counteracting miR-939Mediated transcriptional repression of Bcl-xL. Cancer Research and Treatment. 2018; 50(3): 992–1008.
23. Iguchi T, Uchi R, Nambara S, Saito T, et al. A long noncoding RNA, lncRNA-ATB, is involved in the progression and prognosis of colorectal cancer. Anticancer Research. 2015; 35(3): 1385–1388.

24. Xu M, Chen X, Lin K, Zeng K, et al. The long noncoding RNA SNHG1 regulates colorectal cancer cell growth through interactions with EZH2 and miR-154-5p. Molecular Cancer. 2018; 17(1): 141.
25. Berghoff EG, Clark MF, Chen S, Cajigas I, et al. Evf2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes. Development. 2013; 140(21): 4407–4416.
26. Yin D, He X, Zhang E, Kong R, et al. Long noncoding RNA GAS5 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with colorectal cancer. Medical Oncology. 2014; 31(11): 253.
27. Tang D, Zhao L, Peng C, Ran K, et al. LncRNA CRNDE promotes hepatocellular carcinoma progression by upregulating SIX1 through modulating miR-337-3p. Journal of Cellular Biochemistry. 2019; 120(9): 16128–16142.
28. Zhu L, Liu Y, Chen Q, Yu G, et al. Long-noncoding RNA colorectal neoplasia differentially expressed gene as a potential target to upregulate the expression of IRX5 by miR-136-5P to promote oncogenic properties in hepatocellular carcinoma. Cellular Physiology and Biochemistry. 2018; 50(6): 2229–2248.
29. Han P, Li JW, Zhang BM, Lv JC, et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/β-catenin signaling. Molecular Cancer. 2017; 16(9):1-13.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2021; 11(4) *Original Article*

Investigation of Long Non-coding RNA CRNDE Expression in Iranian Patients with Colorectal cancer

gholaminejad S[1] M.Sc., Deilami Khiabani Z[1] Ph.D., Salehzadeh A[2*] Ph.D., Jalali A[3*] Ph.D.

1. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Rasht, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Arak University, Arak, Iran

* Email corresponding author: salehzadeh@iaurasht.ac.ir, a-jalali@araku.ac.ir

Received: 25 Dec. 2020 Accepted: 15 Mar. 2020

Abstract

Aim: This study aimed to compare the expression levels of LncRNA CRNDE in malignant colorectal tumors and adjacent normal tissues of patients by Real Time-PCR.

Material and Methods: 20 pairs of colorectal tumors and adjacent normal tissue specimens were prepared from the tumor bank of Imam Khomeini Hospital in Tehran University of Medical Sciences. After total RNA extraction from cancerous and normal tissues, cDNA was synthesized, and the expression levels of LncRNA CRNDE were examined using the Real Time-PCR method. A one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test used for statistical analysis of results.

Results: The results showed a two-fold increase in LncRNA CRNDE expression in all 20 colorectal cancer samples compared with the normal cells.

Conclusion: According to the significant increase of the LncRNA CRNDE expression in cancer cells relative to normal cells and its presence in the bloodstream, this LncRNA may be used as a non-invasive diagnostic biomarker for early detection of colorectal cancer.

Keywords: Long noncoding RNA, CRNDE, Colorectal cancer, Biomarker