

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 بیماری‌های کبدی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

مقاله پژوهشی اصیل

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 به منظور 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 استخراج شده 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 تجزیه و تحلیل 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 هر دو بیماری کرون و کولیت بر اساس تمامی مشخصات بیماری که التهاب را نیز شامل می‌شد مورد بررسی قرار گرفتند و اختلاف معناداری در میان بیماران کرون و کولیت در مقایسه با افراد کنترل مشاهده نگردید ($P=0/1340$). در بررسی میزان بیان *lncRNA ANRIL* در دو جنس زن و مرد نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P=0/2571$).

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

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



مقدمه

بیماری‌های التهابی روده^۱ 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^۲ و کولیت اولسراتیو^۳ 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 به واسطه 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 (۴ و ۱). بیماری‌های التهابی روده در کشورهای پیشرفته شایع هستند و شیوع آن‌ها در کشورهای در حال توسعه 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 هم‌چنان 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 (۷ و ۸). 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^۴، تغییرات هیستونی^۵ و RNA های غیرکدکننده^۶ (۹). شواهد نشان می‌دهند که بیشتر مکانیسم‌های اپی‌ژنتیک کنترل بیان ژن، از طریق RNA های غیرکدکننده از قبیل میکروRNA ها^۷، RNA های کوچک^۸ و RNA های طویل^۹ 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 پلیمراز II رونویسی می‌شوند و دارای اثرات اپی‌ژنتیکی سازگار با یک ژن رونویسی شونده هستند.

^۴ DNA Methylation

^۵ Histone Modification

^۶ ncRNAs

^۷ Micro RNAs

^۸ Small ncRNAs: sncRNAs

^۹ Long non coding RNAs: lncRNA

^۱ Inflammatory Bowel Disease: IBD

^۲ Crohn's Disease: CD

^۳ Ulcerative Colitis: UC



این RNA های غیر کد شونده گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده 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 به حساب می‌آید به عنوان مثال *lncRNA UCA1* یک بیومارکر برای تشخیص سرطان مثانه به کار می‌رود (۱۲). زمانی که نقش بیماری‌زای میکرو RNA ها به‌طور گسترده‌ای در بیماری‌های التهابی روده مورد بررسی قرار گرفته بود، مطالعات انگشت‌شماری بر روی نقش *lncRNA* ها متمرکز بودند (۱۳ و ۱۴). عملکرد دقیق *lncRNA* ها در بیماری‌های دستگاه گوارش هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است با این وجود مطالعات اخیر نشان می‌دهند 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 می‌کنند (۱۵ و ۱۶)، که از جمله 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 تأیید 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* به عنوان یک مولکول تنظیمی مهم، بیماری‌های انسانی را در سطوح مختلف میانجی‌گری می‌کند (۱۸). میزان بیان این *lncRNA* در انواع سرطان‌ها از جمله سرطان معده (۱۹)، سرطان ریه (۲۰)، کارسینوم هپاتوسلولار (۲۱)، سرطان رحم (۲۲)، سرطان مثانه (۲۳) خون و... از تنظیم خارج شده و افزایش یافته است (۱۸). هدف از انجام این مطالعه به کارگیری *lncRNA ANRIL* به عنوان بیومارکر استعداد ابتلا به بیماری، بیومارکر پیش‌آگهی زودهنگام، بیومارکر تأیید 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



مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و معیارهای ورود و خروج

این مطالعه مورد - شاهدهی 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. از کلیه 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 مورد استفاده 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 ۶۵ °C برای مدت ۵ دقیقه آن را انکوبه کردیم و در مرحله‌ی بعد یک مخلوط از Ribolock RNase، Reaction buffer و dNTP، inhibitor RivertAid RT را به میکروتیوب



اضافه کرده و در 25°C و به دنبال آن 60°C دقیقه در 42°C انکوبه کردیم.

طراحی پرایمر

پرایمرهای مربوط به ژن ANRIL با نرم‌افزار Gene Runner طراحی و در بخش primer Blast سایت NCBI به منظور 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 ایتیمایز 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 $^{\circ}\text{C}$
ANRIL Forward	5'GCCTCATTCTGATTCAACAGC3'	۲۱	۴۷/۶۲	۵۷/۵۸
ANRIL Reverse	5'GATCTCCCCGGTTTCTTCT3'	۲۰	۵۰	۵۶/۹۲
B2M Forward	5'TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT3'	۲۵	۴۰	۶۰/۳
B2M Reverse	5'TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT3'	۲۲	۵۴/۵۵	۶۱/۹۸

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

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزار Prism و SPSS استفاده شد و داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ 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 $P < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های حاصل از مقایسه بافت‌های بیمار و سالم از

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 Sybergreen صورت گرفت. ژن مرجع در این مطالعه ژن بتا ۲ میکروگلوبولین بود که برای اطمینان از مفاهیم آماری، هر نمونه در هر پلیت به صورت 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.



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 قرار گرفته 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 استفاده شد. میانگین $\pm$ انحراف معیار BMI^۳ افراد مورد مطالعه عبارت است از $22/62 \pm 0/87$ و میانگین $\pm$ انحراف معیار سن افراد مورد مطالعه $33/40 \pm 2/44$ می‌باشد. اطلاعات دموگرافیک بیماران و فراوانی آن‌ها در جدول ۳ قابل مشاهده است.

^۱ Mann-Whitney

^۲ Chi-squared test

^۳ Body mass index



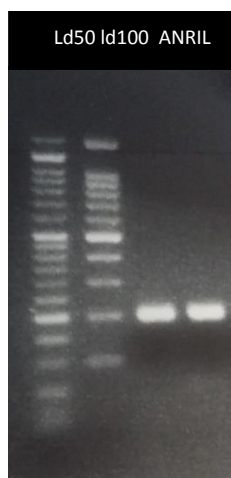
جدول ۳- اطلاعات دموگرافیک بیماران و فراوانی آن‌ها

متغیر	(درصد) فراوانی	
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 مورد مطالعه	IBD	۳۳/۴۰ ± ۲/۴۴
	کنترل	۵۵/۰۰ ± ۱۲/۷۳۲
BMI افراد مورد مطالعه	IBD	۲۲/۶۲۷ ± ۴/۸۹۲
	کنترل	۲۶/۳۳۸ ± ۴/۲۶۳
داروها	Mezazazine	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)

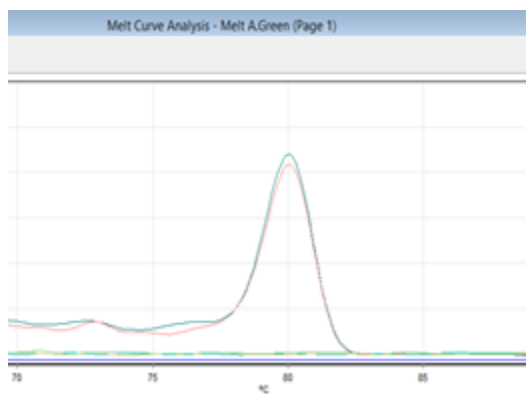
نتایج سنجش کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ حاکی از خلوص بالای آن‌ها و عدم وجود هرگونه آلودگی اعم از پروتئین، بافر و... بود.

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

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



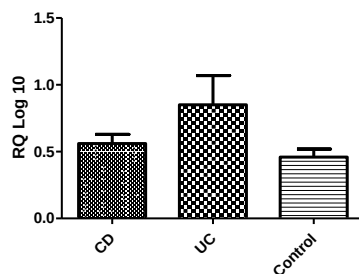
شکل ۱- باند اختصاصی ژن ANRIL بر روی ژل آگارز



شکل ۲- منحنی ذوب مربوط به ژن lncRNA ANRIL

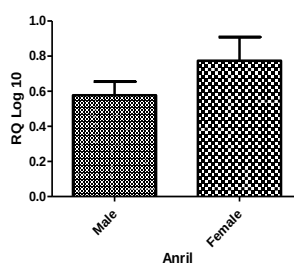
ANOVA way صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

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 UC، CD و کنترل در بیماری‌های التهابی روده که با تست One-



نمودار ۱- مقایسه بیان ژن *ANRIL* بین سه گروه CD، UC و کنترل در بیماری‌های التهابی روده ($P=0/1340$)

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 ($P=0/2571$)

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 سایتوکاین‌ها در مسیر ایمن‌سازی، امروزه روش‌های جدید تشخیص و پیش‌آگهی را تقویت کرده و پندل درمانی را برای بیماری‌های التهابی روده فراهم کرده‌اند. شناسایی بیومارکرها به‌عنوان روش‌های غیر تهاجمی، سودمند و مقرون به‌صرفه می‌تواند رویکرد درمانی مؤثری در بیماری‌های التهابی روده به شمار آید (۲۵). از جمله بیومارکرها نوینی که در بیماری‌های التهابی روده مورد بررسی قرار گرفته‌اند، ncRNA ها هستند که از آن‌ها می‌توان به *lncRNA ANRIL* اشاره کرد.



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 ($P=0/0009$) و کرون ($P=0/041$) 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 ($P=0/1340$) (۲۷).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط میرزا و همکارانش صورت گرفت، پروفایل ترنسکرپتومی 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 ترنسکرپتومیک 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 ($P<0/001$) (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 ($P=0/1340$).

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

^۲ Coronary artery disease

^۱ Pothoulakis



رو بررسی بیان *lncRNA ANRIL* در دوجنس زن و مرد مورد توجه قرار گرفت و تاثیر آن بر روی جنسیت بررسی شد. با توجه به آنالیز داده‌های 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 تکیه بر 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 ایزوفرم‌های مختلف *lncRNA ANRIL* در بیماری‌های التهابی روده نیز مورد بررسی قرار گیرند.

در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد 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. Cleyne 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, Geary RB. Inflammatory bowel disease risk and the environment: Where to next? *Journal of gastroenterology and hepatology* 2016;31(6):1074-5.
7. Geary 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.

14. Noori-Dalooi 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.