

## بررسی بیان ژن های CCDC26 و C-Kit در رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد

سمانه براتی<sup>۱</sup>، سید هادی موسوی<sup>۲</sup>، شعبان علیزاده<sup>۳</sup>، مرجان اسدی<sup>۱</sup>

### چکیده

زمینه و هدف: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، شایع ترین سرطان در کودکان و یکی از عوامل اصلی مرگ و میر آنها در دنیاست. در این مطالعه به بررسی بیان ژن RNA غیر کدکننده ی طویل CCDC26 و همچنین ژن پایین دست آن C-Kit در رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پرداخته ایم.

روش بررسی: این مطالعه از نوع تجربی می باشد. در این مطالعه از رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد T شامل RPMI 8402 و Jurkat و از رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک B شامل Ramos و Daudi استفاده شد. جهت بررسی بیان ژنها از تکنیک qPCR استفاده گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه انجام شد.

یافته ها: در رده های سلولی RPMI8402 و Ramos افزایش بیان معنادار CCDC26 در مقایسه با بیان ژن C-Kit دیده شد ( $p < 0/05$ ) و در رده سلولی RPMI8402 افزایش بیان ژن CCDC26 نسبت به نمونه ی کنترل، معنادار بود ( $p < 0/05$ ). اما در رده های سلولی Jurkat و Daudi افزایش بیان معنادار ژن C-Kit در مقایسه با بیان ژن CCDC26 و همچنین نمونه کنترل دیده شد ( $p < 0/05$ ).

نتیجه گیری: شواهد نشان می دهد که LncRNA نقش مهمی به عنوان یک مارکر در تشخیص و پیش آگهی برخی سرطان ها دارند. یافته های فوق نشان می دهد که ژن CCDC26 که در بالادست ژن C-Kit است، احتمالاً نقش تنظیم کنندگی برای این ژن دارد. ژن C-Kit در رشد و تکثیر سلول های خونی نقش دارد.

واژه های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، RNA غیر کدکننده ی طویل، CCDC26، C-kit

دریافت مقاله : دی ۱۳۹۶

پذیرش مقاله : اردیبهشت ۱۳۹۷

\* نویسنده مسئول :

سید هادی موسوی؛

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی  
تهران

Email :  
hmousavi@tums.ac.ir

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و علوم انتقال خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲ استادیار گروه هماتولوژی و علوم انتقال خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳ دانشیار گروه هماتولوژی و علوم انتقال خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## مقدمه

سرطان های خون حدود ۳/۷ درصد از تمام موارد بیماری های بدخیم را تشکیل می دهند، که حدود ۱۰/۷٪ در زنان و ۱۷/۶٪ در مردان شیوع دارد (۱). لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، بدخیمی ناشی از جهش های سوماتیک چندمرحله ای در یک سلول پیش ساز لنفوئیدی منفرد (B یا T) است که در یکی از چند مرحله تکامل ناشی می شود. تکثیر و تجمع سلول های بلاست کلونال در مغز استخوان، باعث مهار خون سازی و در نهایت کم خونی، نوتروپنی و ترومبوسایتوپنی می شود (۲ و ۳). ALL شایع ترین بدخیمی در کودکان کمتر از ۱۵ سال است که ۲۳ درصد از سرطان ها و ۷۶ درصد از لوسمی ها را در این زیر گروه سنی تشکیل می دهد؛ همچنین ۲۰ درصد لوسمی های حاد را در بزرگسالان شامل می شود، و حدود یک سوم از موارد ALL در بزرگسالان گزارش شده است. بیشترین شیوع آن در سن ۳ تا ۷ سالگی است و ۷۵ درصد موارد قبل از ۶ سالگی رخ می دهد (۴).

عوامل متعددی در ایجاد، پیش آگهی و درمان بیماران ALL دخیل هستند. از جمله مواردی که اخیراً به بررسی آنها در برخی سرطان ها پرداخته اند، RNA های غیر کدکننده ی طویل (lncRNAs) می باشد. در برخی از مطالعات نشان داده شده که lncRNAs تاثیر بسزایی در مرگ سلولی و رشد سلولی با کنترل آپوپتوز در تومورهای توپر، لوسمی ها و گلیوما دارند. lncRNA ها، رونوشت های مشابه mRNA هستند که اندازه ی آن ها در بازه ی ۲۰۰ نوکلئوتید تا کمتر از ۱۰۰ کیلو باز متغیر است و همه ی آنها به استثنای موارد اندکی، فاقد توانایی کد کردن پروتئین هستند (۵). مطالعات انجام شده در رابطه با نقش lncRNA ها در تنظیم الگوی بیان ژن، نشان دهنده ی پیچیده بودن سازوکار کنترلی آنهاست، به نحوی که این مولکول ها در سطوح متفاوتی از تنظیم بیان ژن مشتمل بر تنظیم در سطح رونویسی و نیز پس از رونویسی، درگیر هستند. تنظیم در سطح رونویسی شامل نقش lncRNA ها در غیرفعال سازی اپی ژنتیکی برخی ژن هاست. اما سطوح تنظیمی پس از رونویسی که تحت تأثیر عمل lncRNA ها قرار می گیرند، شامل عوامل متعددی هستند (۶). از بین lncRNA ها، نقش CCDC26 و عملکرد آن در ژن پایین دست یعنی C-Kit در سرطان های خون هنوز به خوبی مشخص نشده است. با مطالعه ای که در رده سلولی K562 انجام داده اند، مشخص شده که تنظیم رشد سلولی در این رده لوسمی با مهار C-Kit از طریق CCDC26

می باشد. اما هنوز نقش این lncRNA در رده های سلولی ALL بررسی نشده است (۷).

عملکرد RNA غیر کدکننده CCDC26 شناخته شده نیست و هیچ مدرکی برای عملکرد مشخص CCDC26 وجود ندارد. CCDC26 بر روی کروموزوم ۸ (24q8) به عنوان یک رمزگذار در نظر گرفته می شود. علاوه بر این، این پروتئین حاوی ۱۰۹ اسیدآمینو می باشد که mRNA آن کدشده و این پروتئین ها هیچ تشابهی با پروتئین های شناخته شده ندارد (۸). با این حال برخی مطالعات به ارتباط بین CCDC26 و سرطان ها از جمله لوسمی میلو بلاستیک حاد (AML) و گلیوما اشاره داشته اند (۷).

C-Kit یا CD117 یک گیرنده ی سیتوکینی است که بر روی بازوی بلند کروموزوم ۴ (4q13) قرار دارد که بر روی سطح سلول های بنیادی خون ساز و همچنین انواع دیگر سلول ها بیان می شود. اشکال تغییر یافته از این گیرنده ممکن است با انواع سرطان ها مرتبط باشد. اتصال C-Kit به گیرنده ی خود بر روی سلول های بنیادی خون ساز باعث فعال سازی C-Kit و در نتیجه اتوفسفریلاسیون و شروع انتقال پیام می شود. پیام رسانی C-Kit باعث بقای سلولی، مهاجرت و تکثیر سلولی می شود (۹ و ۱۰). با خاموش شدن ژن CCDC26، افزایش بیان در گیرنده ی تیروزین کینازی دیده می شود. گیرنده ی تیروزین کینازی Kit باعث حفظ بقای سلول های سرطانی در سلول های بنیادی خون ساز می شود. بنابراین به نظر می رسد که CCDC26 یک RNA غیر کدکننده ی سرکوب کننده ی تومور می باشد، زیرا بیان آن باعث سرکوب بیان ژن C-Kit می شود (۷). با توجه به اهمیت C-Kit در تنظیم پیام رسانی سلول های بنیادی خون ساز و همچنین روشن شدن نقش CCDC26 در تنظیم بیان این ژن، در این مطالعه به بررسی بیان CCDC26 lncRNA و ژن پایین دست آن C-Kit در رده های سلولی ALL پرداخته ایم.

## روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی می باشد. در این مطالعه بررسی بیان ژن های CCDC26 و C-Kit در رده های سلولی ALL انجام گرفت و همچنین از سلول های تک هسته ای خون محیطی به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

## • کشت سلولی

رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد T شامل RPMI

۷۰٪ سرد به رسوب نمونه اضافه شد و با دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۷ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ گردید. در مرحله آخر، اتانول درون میکروتیوپ را کاملاً سروته کردیم تا میکروتیوپ تخلیه شود. سپس رسوب RNA را در ۲۰ میکرولیتر آب DEPC حل کردیم. تا زمان ساخت cDNA آنها را به فریزر -۷۰ منتقل نمودیم.

#### • سنتز cDNA از RNAهای استخراج شده

برای سنتز cDNA در این تحقیق از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز) استفاده شد. باید توجه شود که کلیه مراحل باید با وسایل و محلول های عاری از RNase انجام شود. برای هر نمونه ی خالص شده ی RNA یک لوله ی نیم میلی لیتری انتخاب شد و در آن RNA الگو ۲/۶ میکرولیتر، پرایمر (dT) Oligo ۱ میکرولیتر، آب DEPC ۹/۸ میکرولیتر ریخته شد و حجم نهایی آن ۱۳/۴ میکرولیتر شد. لوله ها در شرایط زیر انکوبه شدند:

پس از سروته کردن و سانتریفوژ کردن کوتاه، ۵ دقیقه در ۷۰°C و سپس روی یخ نگهداری شد. سپس این مواد 5X First Strand butter ۴ μL، dNTPS ۱ μL، RNasin ۰/۵ μL، M-MLV ۱ μL به میکروتیوپ اضافه شد و پس از ۶۰ دقیقه در ۴۲°C به منظور انجام رونویسی معکوس و سپس ۵ دقیقه در ۷۰°C و برای نگهداری به مدت یک هفته در ۲۰°C قرار گرفت.

#### • واکنش زنجیره ای پلی مرز کمی (qPCR)

برای انجام واکنش، ابتدا پرایمر مخصوص ژن ها را با استفاده از برنامه ی نرم افزار طراحی و سپس در سایت Primer blast تأیید کردیم و سپس کارایی پرایمرها با استفاده از تهیه رقت انجام گرفت. برای به دست آوردن کارایی پرایمرها از cDNA سنتز شده، پنج رقت متوالی ۱، ۱/۵، ۱/۲۵، ۱/۱۲۵ و ۱/۶۲۵ تهیه شد. سپس از رقت های فوق طبق پروتکل Real-time به master mix هر پرایمر اضافه شد و در دستگاه Real time قرار داده شد. در نهایت هر غلظت جداگانه در برنامه ی REST2009 قرار گرفت و کارایی واکنش هر پرایمر محاسبه گردید. Master mix استفاده شده (Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red-Amplicon) بود. برای انجام واکنش مواد زیر را (Master Mix Real time (2x): ۷/۵ میکرولیتر، پرایمر (Forward and Reverse): ۱ میکرولیتر، cDNA: ۱ میکرولیتر، DEPC Water: ۶/۵ میکرولیتر، حجم نهایی واکنش: ۱۵ میکرولیتر با ۴۰ چرخه توسط دستگاه Line-gene K انجام شد. تمامی آزمایش های انجام گرفته در این مطالعه به صورت

۸۴۰۲ و Jurkat و از رده های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک B شامل Ramos و Daudi از مرکز انستیتو پاستور فراهم شد.

رده های سلولی فوق براساس دستورالعمل موجود در ATCC، در فلاسک های ۲۵ میلی لیتری (T25) و در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۱۰٪ FBS کشت داده شد. در طول دوره ی کشت، فلاسک حاوی سلول در انکوباتور با دمای ۳۷°C و حاوی CO2 ۵٪ انکوبه گردید و پس از دو روز محیط سلول ها تعویض شد. پس از رشد کافی سلول ها، تعدادی از سلولها فریز و در فریزر -۸۰ و سپس در تانک ازت نگهداری و از فلاسک دیگر جهت شمارش سلولی و استخراج RNA استفاده شد. در طی دوره ی کشت، بقای سلول ها توسط لام هماسیتومتر و تریپان بلو بررسی شد.

#### • جداسازی سلول های تک هسته ای

از سلول های لنفوسیت خون محیطی فرد طبیعی نیز به عنوان نمونه ی کنترل استفاده گردید. در ابتدا از فرد سالم فاقد هر گونه بیماری و مصرف داروی خاص با کسب رضایت نامه ی کتبی نمونه گیری انجام شد. بدین صورت که ۱۰ سی سی خون محیطی در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته شد، سپس جهت جداسازی سلول های تک هسته ای طبق دستورالعمل جداسازی با فایکول کار انجام شد. بلافاصله پس از جداسازی سلول های تک هسته ای، استخراج RNA صورت گرفت.

#### • استخراج RNA

جهت استخراج RNA از کیت تجاری YTZOL pure RNA (یکتا تجهیز آزما) استفاده شد. به طور خلاصه، به رسوب سلولی حاصل از کشت، ۱ ml از تریزول اضافه گردید و سریعاً آن را به فریزر -۳۰ منتقل نمودیم. پس از حدود یک ساعت نمونه را از فریزر خارج کردیم؛ ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم بر روی نمونه اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰۰ g در دمای ۴°C سانتریفوژ کردیم. مایع شفاف یا فاز رویی را به میکروتیوپ حاوی ایزوپروپانل سرد (میکرولیتر ۵۰۰) اضافه نمودیم و حدود ۱۰ دقیقه در فریزر -۳۰ قرار دادیم. میکروتیوپ حاوی محلول RNA و ایزوپروپانل را کاملاً مخلوط کردیم و سپس با دور ۱۲۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شد. پس از انجام سانتریفوژ، سریع تمام مایع رویی رسوب را تخلیه نمودیم و رسوب RNA را با اتانول ۷۰٪ سرد (تهیه شده با آب DEPC) دو بار شستشو دادیم. در هر مرحله ۱ cc اتانول

کارایی، عدد  $R^2$  (ضریب همبستگی)، شیب خط و عرض از مبدأ نشان داده شده اند.

داده های حاصل از Ct نمونه، ابتدا با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  بررسی گردید.

در مقایسه ی بیان ژن های CCDC26 و C-Kit در رده سلولی Daudi مشاهده شد، بیان CCDC26 نسبت به کنترل کاهش بیان داشته که از لحاظ آماری معنادار نبود ( $P < 0/9999$ ) و بیان C-Kit نسبت به کنترل با افزایش بیان همراه بوده ( $P > 0/05$ ) و بیان C-Kit نسبت به CCDC26 افزایش بیان معناداری داشته است ( $P > 0/05$ ).

در مقایسه ی بیان CCDC26 نسبت به ژن کنترل در رده های سلولی Jurkat کاهش بیان مشاهده شد ( $P = 0/9974$ ) و بیان C-Kit نسبت به ژن کنترل افزایش بیان داشته ( $P > 0/05$ ) و در کل، بیان C-Kit نسبت به CCDC26 افزایش بیان داشته است ( $P > 0/05$ ).

در مقایسه ی بیان ژن های CCDC26 و C-Kit در رده سلولی Ramos مشاهده شد که بیان CCDC26 نسبت به ژن کنترل کاهش بیان داشته ( $P > 0/4386$ ) و بیان C-Kit نسبت به ژن کنترل، افزایش بیان داشته ( $P > 0/05$ ) و در کل بیان C-Kit نسبت به GAPDH افزایش بیان داشته است ( $P > 0/05$ ).

در مقایسه ی بیان ژن های CCDC26 و C-Kit در رده سلولی RPMI 8402 مشاهده شد که بیان CCDC26 نسبت به ژن کنترل، افزایش بیان داشته ( $P > 0/0001$ ) و بیان C-Kit نسبت به ژن کنترل، کاهش بیان داشته ( $P < 0/9999$ ) و در کل، بیان CCDC26 نسبت به C-Kit افزایش بیان داشته است ( $P > 0/0001$ ).

سه بار تکرار بوده است. در این مطالعه، جهت بررسی مقایسه بیان ژن های مذکور در بین رده های سلولی با سلول های تک هسته ای فرمول ۲ استفاده گردید.

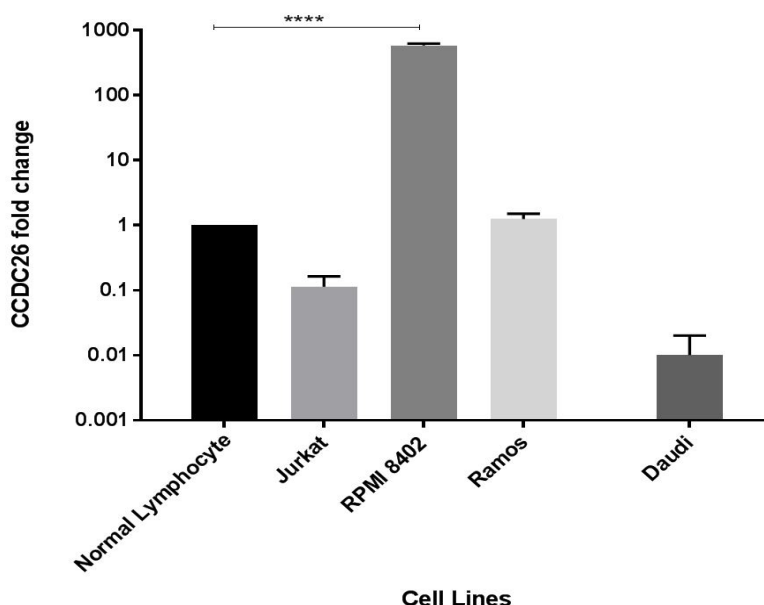
### • آنالیز آماری

در این مطالعه، آنالیز آماری آنوای یک طرفه با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism V6.07 انجام گرفت. داده ها به صورت میانگین انحراف از معیار (mean±SD) نمایش داده شدند. حدود اطمینان، در تمامی آزمایش ها ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و مقادیر P کمتر از ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ به ترتیب با یک ستاره (\*)، دو ستاره (\*\*)، سه ستاره (\*\*\*) و چهار ستاره (\*\*\*\*) نشان داده شدند.

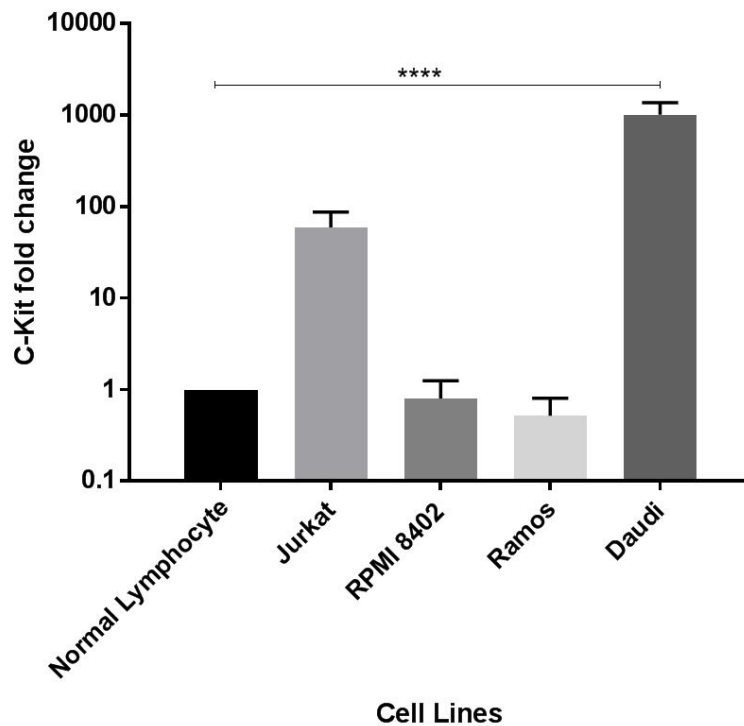
### یافته ها

#### • نتایج حاصل از Quantitative Real-time PCR

در این مطالعه برای بررسی بیان کمی ژن های CCDC26 و C-Kit واکنش Real Time PCR توسط دستگاه line-gene k و با مستر میکس شرکت Takara انجام گردید. بیان LncRNA نام برده شده با استفاده از GAPDH به عنوان کنترل داخلی نرمال سازی شد. نتایج حاصل از منحنی ذوب و تکثیر (به صورت خطی) مربوط به رونوشت های CCDC26، C-Kit و ژن GAPDH (به عنوان کنترل داخلی) با استفاده از نرم افزار Line Gene بررسی شد. منحنی استاندارد ژن های C-Kit، CCDC26، GAPDH، نتایج مربوط به



نمودار ا: بیان ژن CCDC26 در رده های مختلف سلولی نسبت به نمونه ی کنترل



نمودار ۲: بیان ژن C-Kit در رده های مختلف سلولی نسبت به نمونه ی کنترل

سلول های بلاست کلونال در مغز استخوان، باعث مهار خون سازی و در نهایت کم خونی، نوتروپنی و ترومبوسایتوپنی می شود. مطالعات انجام شده در رابطه با نقش lncRNA ها در تنظیم الگوی بیان ژن، نشان دهنده ی پیچیده بودن سازوکار کنترلی آنهاست، به نحوی که این مولکول ها در سطوح متفاوتی از تنظیم بیان ژن مشتمل بر تنظیم در سطح رونویسی و نیز پس از رونویسی، درگیر هستند. تنظیم در سطح رونویسی شامل نقش lncRNA ها در غیرفعال سازی اپی ژنتیکی برخی ژن هاست. اما سطوح تنظیمی پس از رونویسی تحت تأثیر عمل lncRNA ها قرار می گیرند (۱۲).

CCDC26 بر روی کروموزوم ۸ (24q8) به عنوان یک رمزگذار RNA غیرکدکننده ی طویل در نظر گرفته می شود. با وجود ماهیت مبهم CCDC26، با تجزیه و تحلیل گسترده ژنوم چندین شواهد از ارتباط CCDC26 با تومورهای خاص از جمله گلیوما و AML دیده شده که در آن افزایش کل یا بخشی از لکوس ژنتیکی CCDC26 در کودکان مبتلا به سرطان خون حاد مشاهده شده است. همچنین به نظر می رسد که CCDC26 سلول لوسمی میلوئیدی در حال رشد را از طریق تنظیم بیان Kit کنترل می کند (۸ و ۹).

یکی از فاکتورهای مهم در حفظ و بقای سلول های بنیادی خون ساز C-Kit می باشد، به طوری که اتصال این ژن به گیرنده ی خودش بر سطح سلول های بنیادی می تواند باعث فعال شدن مسیر

در نمودارهای فوق (نمودار ۱ و نمودار ۲) مقایسه ی بیان ژن های CCDC26 و C-Kit در رده های سلولی مختلف نسبت به نمونه ی کنترل آورده شده است. در مورد ژن CCDC26 تنها تغییر بیان این ژن در رده سلولی RPMI8402 نسبت به نمونه ی کنترل معنادار بود ( $P > 0.0001$ )، و در مورد ژن C-Kit تنها بیان این ژن در رده سلولی Daudi نسبت به نمونه ی کنترل معنادار بود ( $P > 0.0001$ ).

## بحث

بر طبق آمار گزارش شده توسط سازمان بهداشت جهانی، سرطان خون در سال ۲۰۱۲ در ۳۵۲ هزار نفر در سراسر دنیا شایع شد و از این میان باعث مرگ ۲۶۵ هزار نفر گردید (۱۱).

این نوع لوسمی در کودکان بین ۲ تا ۵ سال بسیار شایع است. نجات جان کودکان مبتلا از ۱۰ درصد در سال ۱۹۶۰ به ۹۰ درصد در سال ۲۰۱۵ رسیده است. بروز ALL در مناطق جغرافیایی مختلف به طور قابل توجهی متفاوت است. بروز ALL در بین سنین ۲ تا ۳ سالگی تقریباً ۴ برابر بیشتر از سایر سنین در کودکان می باشد، اما بیشتر مرگ ناشی از ALL، حدود هر چهار نفر از پنج نفر در بزرگسالان رخ می دهد (۳). ALL نئوپلازی است که از جهش های سوماتیک چند مرحله ای در یک سلول پیش ساز لنفوئیدی منفرد (B یا T) در یکی از چند مرحله تکامل ناشی می شود. تکثیر و تجمع

پایین دست و در نتیجه منجر به تکثیر، تمایز، بقا، چسبندگی، حرکت و رگ زایی شود(۱۳). در مطالعات متعددی به نقش C-Kit در ایجاد تومور پرداخته اند و نشان داده اند که بیان نابجای این ژن می تواند زمینه ساز ایجاد بسیاری از تومور ها باشد(۱۴).

با توجه به داده های حاصل از آنالیز آماری در مطالعه ی انجام شده، بیان CCDC26 در رده های سلولی Daudi و Jurkat نسبت به C-Kit به عنوان عاملی در گسترش سرطان کاهش داشته است و در مقابل، بیان CCDC26 نسبت به بیان C-Kit در رده های سلولی Ramos و RPMI 8402 افزایش داشته است. در این مطالعه با توجه به داده های آماری، بیان CCDC26 هم در رده سلولی B و هم در رده سلولی T افزایش داشته است. احتمالاً بیان CCDC26 می تواند عاملی برای سرکوب کردن ژن C-Kit و جلوگیری کننده از عملکرد آن باشد. مشاهده شد که در رده های سلولی که بیان CCDC26 کاهش داشته ژن C-Kit بیان شده، اما در رده ای که بیان CCDC26 افزایش داشته بیان ژن C-Kit مهار شده و احتمالاً از فعالیت های انکوژنی و افزایش تکثیر سلولی و مهار آپوپتوز و همچنین مهاجرت سلولی و مقاومت دارویی جلوگیری می شود. تنها مطالعه ای که در این زمینه در ارتباط با تاثیر بیان ژن CCDC26 بر روی ژن C-Kit در رده سلولی AML انجام شد، تایید کننده این یافته ی ما در عملکرد مهار C-Kit توسط CCDC26 می باشد.

در سال ۲۰۱۶، Jiang و Peng به بررسی بیان ژن CCDC26 در بیماران با سرطان پانکراس پرداختند و نشان دادند که این ژن در افراد بیمار نسبت به افراد طبیعی بیان بالاتری دارد و بیان نمودند که این ژن می تواند به عنوان یک انکوژن در این بیماران عمل نماید(۱۵). در تحقیق دیگری در سال ۲۰۱۸، Cao و همکاران به ارتباط بین CCDC26 و C-Kit در سرطان دستگاه گوارش پرداختند و نشان دادند که در مهار CCDC26 بیان C-Kit افزایش می یابد و این افزایش بیان C-Kit با مقاومت دارویی همراه است(۱۶).

در سال ۲۰۱۵، Hirano نشان داد که برخی RNA های غیرکدکننده از جمله CCDC26 در لوسمی حاد میلوئیدی دوران کودکی افزایش بیان دارد و نقش CCDC26 را به عنوان

## منابع

سرکوب کننده ی تومور نشان داد و همچنین نشان داد که با کاهش بیان CCDC26 بیان ژن C-Kit افزایش می یابد، که ژن Kit در بقا و گسترش تومور نقش بسزایی دارد و از افزایش بیان CCDC26 باعث کاهش بیان C-Kit می شود به جهت درمان در این بیماران پیشنهاد می کند(۸). در مطالعه ی حاضر بیان RNAهای غیرکدکننده در رده سلولی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انتخاب این RNAهای غیرکدکننده در این بیماری این بوده است که از آنجاکه تاکنون هیچ مطالعه ای روی آن ها در این بدخیمی انجام نشده است، به علت افزایش نرخ سرطان در جوامع و پیشرفت علم در تشخیص و درمان این نوع بدخیمی ها امید است که این مطالعه شروعی برای دست یافتن به اطلاعات کافی جهت درمان مبتلایان باشد.

## نتیجه گیری

در مطالعه ی حاضر طبق نتایج به دست آمده، بیان CCDC26 در رده های سلولی Daudi و Jurkat کاهش و بیان C-Kit افزایش داشته است. در مقابل، در رده های سلول های RPMI 8402 و Ramos که بیان CCDC26 افزایش داشته، بیان C-Kit کاهش معناداری داشته است. الگوی بیان CCDC26 در رده های سلولی Daudi، Ramos، Jurkat و RPMI8402 می تواند نشان دهنده ی وجود نقش بالقوه ی این RNA غیرکدکننده در تنظیم بیولوژی این نوع لوسمی باشد. لذا این مطالعه اولین داده ها را در مورد بیان این ژن ها در لوسمی لنفوبلاستیک حاد در اختیار قرار می دهد که امید است به عنوان اولین قدم در بررسی بیشتر این نوع ژن ها در سرطان ها به خصوص لوسمی ها باشد.

## تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران و دانشجویانی که در این طرح با ما همکاری کردند کمال تشکر را داریم. این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی و خدماتی بهداشتی درمانی تهران به شماره قرار دارد ۱۳۹۵/۲/۲۸ مورخ ۳۱۴۶۱-۳۱-۰۱-۹۵ می باشد.

1. Grada Z, Paquette C, Eklund CM, Zhang C, Sung CJ, Steinhoff M, et al. Evaluating the age cutoff criterion for reporting benign-appearing endometrial cells in routine Pap tests: An 8-year retrospective review. *Acta Cytologica* 2017; 61(3): 194-8.

2. Treviño LR, Yang W, French D, Hunger SP, Carroll WL, Devidas M, et al. Germline genomic variants associated with childhood acute Lymphoblastic Leukemia. *Nature Genetics* 2009; 41(9): 1001-5.
3. Hunger SP & Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in children. *New England Journal of Medicine* 2015; 373(16): 1541-52.
4. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, et al. Loci on 7p12. 2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute Lymphoblastic Leukemia. *Nature genetics* 2009; 41(9): 1006-10.
5. Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A & Calin GA. Long non-coding RNAs and cancer: A new frontier of translational research? *Oncogene* 2012; 31(43): 4577-87.
6. Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, Fox AH, Fortini E, Moscato P, et al. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome research* 2012; 22(5): 885-98.
7. Hirano T, Yoshikawa R, Harada H, Harada Y, Ishida A & Yamazaki T. Long noncoding RNA, CCDC26, controls Myeloid Leukemia cell growth through regulation of KIT expression. *Molecular Cancer* 2015; 14(1): 90.
8. Hirano T. The role of the CCDC26 long noncoding RNA as a tumor suppressor. *RNA & DISEASE* 2015; 3(2): 1-9.
9. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-Kit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999; 31(10): 1037-51.
10. Tohda S, Yang G, Ashman L, McCulloch E & Minden M. Relationship between C-Kit expression and proliferation in acute Myeloblastic Leukemia cell lines. *Journal of Cellular Physiology* 1993; 154(2): 410-8.
11. Stewart BW & Wild CP. *World cancer report 2014*. Geneva: World Health Organization; 2014: 505.
12. Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y & Song Y. Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Letters* 2013; 339(2): 159-66.
13. Foster BM, Zaidi D, Young TR, Mobley ME & Kerr BA. CD117/c-Kit in cancer stem cell-mediated progression and therapeutic resistance. *Biomedicines* 2018; 6(1): 31.
14. Ashman LK & Griffith R. Therapeutic targeting of C-Kit in cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2013; 22(1): 103-15.
15. Peng W & Jiang A. Long noncoding RNA CCDC26 as a potential predictor biomarker contributes to tumorigenesis in Pancreatic cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 83(1): 712-7.
16. Cao K, Li M, Miao J, Lu X, Kang X, Zhu H, et al. CCDC26 knockdown enhances resistance of gastrointestinal stromal tumor cells to imatinib by interacting with C-Kit. *American journal of Translational Research* 2018; 10(1): 274-82.

## Investigating the Expression of CCDC26 and C-Kit Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines

Samaneh Barati<sup>1</sup>(B.S.) - Seyed Hadi Mousavi<sup>2</sup>(Ph.D.) - Shaban Alizadeh<sup>3</sup>(Ph.D.) - Marjan Asadi<sup>1</sup>(B.S)

1 Master of Sciences Student in Hematology & Blood Transfusion Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Assistant Professor, Hematology & Blood Transfusion Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Associate Professor, Hematology & Blood Transfusion Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

Received: Dec 2017

Accepted: Apr 2018

**Background and Aim:** Acute Lymphoblastic Leukemia is the most common cancer in children and is one of the main causes of their mortality. In this study, we examined the expression of long noncoding RNA CCDC26 gene and its downstream C-Kit gene in acute lymphocytic Leukemia cell line.

**Materials and Methods:** This is an experimental study. In this study, the acute Lymphoblastic Leukemia cell lines T (RPMI 8402 and Jurkat) and the cell lines of Lymphoblastic B Leukemia (Daudi and Ramos) were used. After culture, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. In order to study the expression of CCDC26 and C-Kit genes, Real Time PCR technique was done. One-way ANOVA test was performed to analyze the results.

**Results:** In RPMI8402 and Ramos cells, a significant increase in expression of CCDC26 was observed in comparison with the expression of the C-Kit gene ( $P < 0.05$ ) and in the RPMI8402 cell line, the expression of the expression of the CCDC26 gene was significant ( $p < 0.05$ ) But in the Jurkat and Daudi cell lines, the significant increase of C-Kit gene expression was observed as compared to the expression of the CCDC26 gene as well as the control sample ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Evidence suggests that lncRNA plays an important role as a marker in the diagnosis and prognosis of some cancers. The findings suggest that the CCDC26 gene located on the upstream of the C-Kit gene has a regulating role for this gene. The C-Kit gene plays a role in the growth and proliferation of blood cells.

**Keywords:** Acute Lymphoblastic Leukemia, lncRNA, CCDC26, C-Kit

\* Corresponding Author:

Mousavi SH

Email:

hmousavi@tums.ac.ir