ORIGINAL ARTICLE

Bioinformatics and Experimental Evaluation of UBE2W and SSX2IP Expression Levels in HepG2 Cancer Cells Treated with Melatonin

Ali Rajabi[1],
Ali Emami[2],
Behnaz Barzegarzadeh Namarvar[3],
Reza Safaralizadeh[4]

[1] PhD Student in Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] MSc in Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] MSc in Animal Physiology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received May 19, 2020 ; Accepted October 4, 2020)

Abstract

Background and purpose: The aim of this study was to bioinformatically and experimentally evaluate the effect of melatonin on the expression levels of *UBE2W* and *SSX2IP* genes in melatonin treated Human Hepatocellular carcinoma G2 (HepG2) cancer cell line. *UBE2W* encodes a protein that promotes ubiquitination of Fanconi anemia complementation group proteins and may be important in the repair of DNA damage. *SSX2IP* belongs to an adhesion system, involved in cell movement and acts as a centrosome maturation factor.

Materials and methods: At first, as a bioinformatics tool, MATLAB 2018a software was employed to evaluate the *UBE2W* and *SSX2IP* genes expression levels using microarray data. Then, after designing and preparing the primers, MTT and Real-time PCR were carried out in three replicates.

Results: MTT assay showed that the viability of cancer cell significantly decreased in melatonin treated group ($P \leq 0.01$). The IC_{50} value was estimated to be 2080 µM for 48 hours, but no significant changes were seen in the survival of human normal cells (HUVEC-C) ($P \geq 0.05$). Real-time PCR proved that the expression levels of both genes increased ($P \geq 0.05$ in 24h and $P \leq 0.05$ in 48h) in melatonin treated cells compared to un-treated group, which was in accordance with bioinformatics analysis.

Conclusion: Our study showed that *UBE2W* and *SSX2IP* genes could be used as therapeutic target genes for Hepatocellular carcinoma. However, complementary studies are needed to prove current findings.

Keywords: melatonin, Hepatocellular carcinoma, bioinformatics, microarray data

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 30 (192): 12-23 (Persian).

* **Corresponding Author: Reza Safaralizadeh -** Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran (E-mail: safaralizadeh@tabrizu.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 192 دی سال 1399 (23-12)

مطالعه بیوانفورماتیکی و تجربی بیان ژن های *UBE2W* و *SSX2IP* در سلول های سرطانی HepG2 تیمار شده با ملاتونین

علی رجبی[1]
علی امامی[2]
بهناز برزگرزاده نمرور[3]
رضا صفرعلیزاده[4]

چکیده

سابقه و هدف: هدف از مطالعه حاضر ارزیابی بیوانفورماتیکی و تجربی بیان ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* در رده سلولی Human Hepatocellular carcinoma G2) HepG2) تیمار شده با داروی ملاتونین می‌باشد. ژن *UBE2W*، پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که باعث افزایش یوبی‌کویتینه شدن پروتئین‌های گروه مکمل آنمی فانکونی شده و ممکن است در ترمیم آسیب DNA مهم باشد. *SSX2IP* متعلق به سیستم اتصال سلولی است که در حرکت سلول دخیل است و به عنوان یک عامل بلوغ سانتروزوم عمل می‌کند.

مواد و روش‌ها: در ابتدا، نرم‌افزار MATLAB 2018a برای ارزیابی میزان بیان ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* از داده‌های میکرو آرایه مورد استفاده قرار گرفت. بعد از طراحی و تهیه پرایمرها، آزمایشات تجربی شامل تست MTT و Real-time PCR بصورت سه تکرار انجام گرفت.

یافته‌ها: نتیجه تست MTT نشان داد که زنده مانی سلول مورد مطالعه در گروه تیمارشده با ملاتونین به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. میزان IC50 برای 48 ساعت برابر 2080 میکرومولار تخمین زده شد($P<0/01$)، اما تغییرات معنی‌دار در زنده مانی سلول‌های سالم انسانی (HUVEC-C) دیده نشد($P\geq0/05$). نتایج Real-time PCR ثابت کرد که میزان بیان هر دو ژن مورد مطالعه در سلول‌های تیمار شده با ملاتونین در مقایسه با گروه شاهد افزایش (غیر معنی‌دار $P>0/05$ در 24 ساعت و معنی‌دار $P<0/05$ در 48 ساعت) می‌یابد که هم راستا با نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی می‌باشد.

استنتاج: بر اساس نتایج این مطالعه *UBE2W* و *SSX2IP* می‌تواند به عنوان ژن هدف در درمان سرطان کارسینومای کبدی به کار گرفته شود، اگرچه برای تایید این نتایج نیاز به انجام مطالعات گسترده می‌باشد.

واژه های کلیدی: ملاتونین، کارسینومای هپاتوسلولار، بیوانفورماتیک، داده‌های میکرو آرایه

مقدمه

کارسینومای سلول‌های کبدی از جمله سرطان‌های شایع در جهان می‌باشد که سبب مرگ و میر حدود 600 هزار نفر در سال می‌شود(1). اگرچه در سال‌های اخیر پیشرفت‌های مهم و امیدوارکننده‌ای در رابطه با تشخیص

مولف مسئول: رضا صفر علیزاده - تبریز: دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی
E-mail: safaralizadeh@tabrizu.ac.ir
1. دانشجوی دکترای ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
2. کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
3. کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
4. دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت: 1399/2/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/3/18 تاریخ تصویب: 1399/7/13

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

زودهنگام و روش‌های درمانی به‌دست آمده است، با این حال هنوز مرگ و میر فراوانی به دلیل عود و بازگشت بیماری اتفاق می‌افتد(2).

از درمان سرطان‌ها می‌توان به جراحی (surgery)، شیمی درمانی (chemotherapy) و رادیوتراپی (radiotherapy) اشاره کرد. عدم تشخیص زودهنگام بیماری، توزیع سیستمیک غیر اختصاصی دارو بین سلول‌های سرطانی و سالم، عدم توانایی تثبیت پاسخ‌های درمانی، تحویل دارو به طور ناقص و عدم قرارگیری آن به میزان مناسب در محل هدف که منجر به بروز مقاومت چند دارویی می‌شود، از محدودیت‌های مهم درمان سرطان محسوب می‌شوند(4،3). امروزه بیش‌تر داروهای ضد سرطانی قابل دسترس و تجاری، به روش شیمیایی تولید شده‌اند و به دلیل عوارض جانبی از جمله اعمال سمیت سلولی علیه سلول‌های سرطانی و سالم پس از مدتی کارایی خود را از دست می‌دهند. بنابراین پژوهشگران بر روی ترکیبات دارویی با هدف جایگزینی آن‌ها با داروهای سنتتیک شیمیایی تمرکز کرده‌اند و یافتن ترکیبات درمانی جدید با منشأ طبیعی با حداقل عوارض درمانی که بتوانند به صورت هدفمند و با مکانیسم مشخص سلول‌های سرطانی را از بین ببرند، اهمیت بالایی پیدا کرده است. ملاتونین (ان- استیل- 5- تریپتامین) اولین بار در سال 1987 توسط Learner و همکاران شناسایی و استخراج شد. ملاتونین نقش قابل توجهی را در سیستم ساعت بیولوژیک ایفا می‌کند و از خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی برخوردار است(5). میزان این هورمون در نیمه شب به بیش‌ترین مقدار و در طول روز به کم‌ترین مقدار ممکن خود می‌رسد. مطالعات نشان داده است که ملاتونین به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی از خاصیت ضد سرطانی قابل توجهی برخوردار است(6). به‌طوری‌که مشخص شده است ملاتونین باعث کاهش علایم بسیاری از سرطان‌ها، مهار آنژیوژنز، تکثیر و متاستاز (تهاجم) می‌گردد(7). به علاوه ملاتونین دارای خاصیت انکواستاتیک بر روی سرطان به ویژه سرطان‌های وابسته به هورمون است(9،8). اگرچه تحقیقات انجام شده نشان داده است که مکانیسم عمل ضدسرطانی ملاتونین به واسطه مسیرهای پیام رسانی استروژنی است(10)، با این حال تاثیر آن بر روی بیان ژن‌های کنترل‌کننده رشد سلولی به صورت دقیق مورد مطالعه قرار نگرفته است. بسیاری از ژن‌های درگیر در ایجاد سرطان‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از آن‌جاکه ژن‌های کنترل‌کننده رشد حاوی اطلاعاتی برای جلوگیری از تقسیم غیرکنترل شده سلول هستند، بنابراین می‌توان از آن‌ها به عنوان ژن‌های محافظت‌کننده از سرطان یاد کرد. ژن‌های سرکوبگر تومور(tumor suppressor genes)، انکوژن‌ها و ژن‌های تعمیرکننده جهش‌های عدم تطابق (mismatch) از آن جمله می‌باشند(13-11). ژن‌های تعمیرکننده عدم تطابق در شناسایی و تعمیر اشتباهات اطلاعات ژنتیکی که در حین همانندسازی یا در اثر عوامل جهش‌زا ایجاد می‌شوند نقش دارند، در صورت آسیب دیدن این ژن‌ها اشتباهات موجود در DNA تصحیح نشده و با بروز جهش و تجمع آن سرطان می‌تواند ایجاد شود(14).

UBE2W یک پروتیئن آنزیمی درون سلولی است و عمل یوبی کوئیتیناسیون را تنها به واسطه E2 (یکی از سه روش یوبی کوئیتیناسیون) جهت تسهیل تشکیل پیوند ایزوپپتید با قسمت c- ترمینال بستر انجام می‌دهد(15). میزان بیان ژن انواع یوبی کوئیتین‌ها در سرطان‌های مختلف متفاوت است. برای مثال اختلال در میزان بیان *UBE2W* باعث یوبی کوئیتیناسیون پروتین P53 شده و این امر هم منجر به پیشرفت سرطان (ریه) می‌شود. مشخص شده که هدف قرار دادن یوبی کوئیتین می‌تواند از روش‌های موثر ایمونوتراپی تلقی شود(17،16). یوبی کوئیتیناسیون نقش مهمی در مسیرهای مختلف سلولی از جمله پاسخ به استرس و ترمیم DNA دارد(18). ژن *SSX2* عضو دوم از خانواده Synovial sarcoma X (SSX) بوده و روی کروموزوم X قرار گرفته است. محصول این ژن متعلق به خانواده پروتئین‌های همولوگ

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

(homologous) نقطه شکست سارکوم سینوویال X (SSX) است. این پروتئین‌ها ممکن است به عنوان سرکوبگرهای رونویسی عمل کنند. آن‌ها همچنین قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال به صورت خود به خود در بیماران سرطانی هستند و اهداف بالقوه مفیدی در ایمنی درمانی مبتنی بر واکسن سرطان هستند. این ژن و همچنین اعضای خانواده *SSX1* و *SSX4* در جابه‌جایی t (X;18)(p11.2;q11.2) دخیل هستند که به‌طور معمول در همه سارکومای سینوویال یافت می‌شوند. این جابه‌جایی منجر به تلفیق ژن جابجایی سارکوم سینوویالی روی کروموزوم 18 به یکی از ژن‌های *SSX* در کروموزوم X می‌شود. پروتئین‌های ترکیبی رمزگذاری شده احتمالاً مسئول ویژگی سرطانی هستند. میزان بیان این ژن در سرطان‌های مختلف متفاوت است. علاوه بر این، استفاده از پروتین‌های *SSX2* و *SSX2IP* به عنوان پروتئین هدف برای درمان تومور پیشنهاد شده است(20،19). در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر ملاتونین بر میزان بیان ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* در رده سلولی HepG2 (به عنوان مدل سرطان کارسینومای کبدی) به دو روش بیوانفورماتیکی و تجربی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

روش آنالیز بیوانفورماتیکی برای تشخیص top 10 hub genes

به منظور انجام مطالعه بیوانفورماتیکی، ابتدا داده‌های بیان چندین هزار ژن که توسط تکنولوژی‌های میکرو آرایه تهیه شده بودند از بانک داده‌های GEO (Gene Expression Omnibus) Dataset پایگاه داده NCBI با کد دسترسی GSE132119 جمع‌آوری شد. سپس پیش پردازش‌هایی روی این داده‌ها انجام گرفت و توسط الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی شبکه عصبی که تحت عنوان روش Probabilistic neural networks (PNN) گفته می‌شود، آنالیز شدند(21). این روش بر پایه جستجو بین ژن‌ها عمل می‌کند و از بین آن‌ها ژن‌هایی را که با بیش‌ترین دقت، حساسیت و اختصاصیت قادر هستند بین نمونه‌های کنترل و غیرکنترل تمایز قائل شوند را انتخاب می‌کند. در مرحله بعد تعداد 10 ژن که دارای بیش‌ترین امتیازها و یا تاثیرپذیری است توسط الگوریتم انتخاب و دسته‌بندی شدند. تمامی پیاده‌سازی‌ها توسط نرم افزار MATLAB 2018 a انجام گردید و اعتبار بیولوژیکی ژن‌های انتخاب شده با بررسی مقالات منتشر شده و سایت Gene MANIA سنجیده شد. در نهایت شبکه بیانی ژن‌های انتخاب شده توسط نرم افزار Cytoscape رسم شد. برای این منظور، به ژن‌های انتخاب شده نمره داده شد و سپس با داده‌های جمع‌آوری شده از دیفالت Gene MANIA مرج (merge) شدند و بعد از آنالیز در نرم‌افزار Cytoscape رسم شد (تصویر شماره 1).

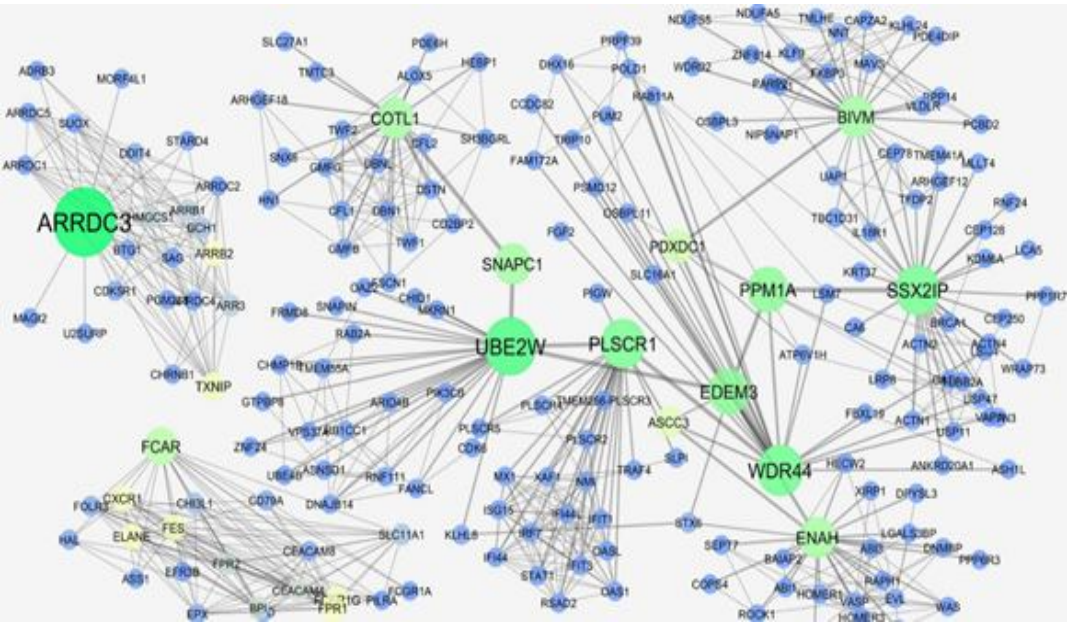
کشت سلولی

به منظور انجام بخش تجربی این مطالعه ابتدا رده‌های سلولی سرطان کارسینومای کبد HepG2 (Human Hepatocellular carcinoma G2) و HUVEC-C (Human umbilical vein/vascular endothelium) بر اساس راهنمای استفاده از این سلول‌ها از تانک ازت موجود در دانشکده علوم طبیعی - دانشگاه تبریز خارج و عمل یخزادیی در داخل 5 میلی‌لیتر محیط کشت کامل RPMI (USA, Gibco) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین 100 U/ml، استرپتوماسین 100 mg/ml و 10 درصد سرم گوساله تازه متولد شده FBS (Gibco,USA) انجام گرفت و سپس تحت شرایط دی‌اکسیدکربن 5 درصد و دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

تست سمیت سلولی

سمیت سلولی ملاتونین بر روی زیستایی سلول‌های HepG2 و HUVEC-C با استفاده از تست MTT در دو زمان 24 و 48 ساعت ارزیابی شد. برای این منظور، هر یک از چاهک‌های پلیت 96 خانه‌ای با 200 میکرولیتر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]



تصویر شماره 1: ارتباط top 10 hub genes ها با هر کدام از اعضای خود و ژن‌های زیرمجموعه خودشان را نشان می‌دهد که خط واصل بین دو ژن قدرت ارتباط آن ها را نشان می دهد و همچنین اندازه و رنگ گره ها بیانگر تعداد ارتباطات هر ژن با ژن های دیگر می باشد.

از محیط کشت RPMI 10% FBS حاوی 15 هزار سلول توزیع شدند. هر کدام از پلیت‌ها به مدت 24 ساعت انکوبه شد و بعد از رسیدن به تراکم بالای 70 درصد، تیمار سلولی با غلظت‌های 1، 10، 100، 200، 400، 500، 1000 میکرومولار از ملاتونین (Sigma Aldrich, Germany) انجام شد. بعد از گذشت 24 و 48 ساعت از زمان تیمار، 50 میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک برداشته شده و با 50 میکرولیتر محلول MTT (Sigma Aldrich, Germany) (با غلظت 2mg/ml) عوض شد. بعد از 4 ساعت انکوباسیون، محیط کشت هر یک از چاهک‌ها خارج و با 200 میکرو لیتر DMSO تعویض شد. در نهایت بعد از 30 دقیقه انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد جذب فرمازان بلو در 570nm با استفاده از دستگاه الایزاریدر سنجیده شد.

استخراج RNA

به منظور ارزیابی بیان ژن‌ها، 200 هزار سلول HepG2 در داخل هر کدام از چاهک‌های پلیت شش خانه‌ای توزیع شدند و بعد از رسیدن به تراکم مناسب با ملاتونین (در غلظت 2080 میکرومولار IC_{50} 48 ساعت) تیمار شدند. و بعد از گذشت 24 و 48 ساعت RNA سلول‌ها به واسطه کیت استخراج (Invitrogen, USA) TRIZOL استخراج گردید. ابتدا یک میلی‌لیتر از کیت ترایزول بر روی حدود یک میلیون سلول اضافه شده و پیپتاژ کامل سلولی انجام و به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد 200 میکرولیتر کلروفروم (Merck, Germany) به هر نمونه افزوده شد و به مدت 15 ثانیه به شدت تکان داده شد. نمونه موردنظر پس از ورتکس و قرار گرفتن در دمای اتاق به مدت 3 دقیقه، به مدت 20 دقیقه با سرعت 12000 rpm سانتریفیوژ شد. فاز بالایی با 500 میکرولیتر ایزوپروپانول (Merck, Germany) مخلوط شد و پس از مدت زمان 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد با سرعت 12000rpm سانتریفیوژ شد. اتانول 75 درصد به رسوب RNA بدست آمده اضافه شد و سپس سانتریفیوژ به مدت 8 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد با دور

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

7500 rpm صورت گرفت تا RNA شسته شود. در نهایت RNA در آب حاوی دی‌اتیل پیروکربنات DEPC (Sigma Aldrich, Germany) حل شد و کیفیت آن با استفاده از نانودراپ بررسی شد.

سنتز cDNA

در مرحله سنتز cDNA ابتدا باید RNA استخراج شده را به توالی DNA تبدیل کرد. برای این منظور از تکنیک RT-PCR استفاده می‌شود. در این روش با استفاده از توالی‌های شش نوکلئوتیدی تصادفی که به طور تصادفی به توالی RNAها متصل می‌شوند واکنش RT-PCR شروع می‌شود. برای سنتز cDNA، 2 میکروگرم از RNA را در داخل میکروتیوب ریخته و 1 میکرولیتر DNase I و بافر آن به میکروتیوب افزوده می‌شود. در مرحله بعد به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده می‌شود. برای مهار عملکرد آنزیم DNase I، 1 میکرولیتر EDTA به میکروتیوب اضافه شده و به مدت 10 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر به منظور غیرفعال شدن آنزیم، قرار گرفت. در ادامه، 3/5 میکرو لیتر از محتویات کیت سنتز cDNA به RNA تیمار شده با آنزیم DNase I افزوده شده و طبق دستورالعمل شرکت (Invitrogen) به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در نهایت به مدت 5 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. Real time PCR برای بررسی کمی بیان ژن‌های مذکور مورد استفاده گرفت. به این منظور، برنامه Real time PCR در 45 سیکل و با دمای مناسب پرایمرهای ژن‌های مذکور (جدول شماره 1) و با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q-QIAGEN انجام شد. مواد مورد استفاده و غلظت‌های مروبوطه در (جدول شماره 2) ذکر شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS PASW Statistic18 و آزمون‌های student's t-Test و one way anova مورد ارزیابی قرارگرفتند. همچنین تمامی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad PRISM Version 4.01 رسم شدند.

جدول شماره 1: پرایمرهای مورد استفاده به همراه توالی آن ها

پرایمر	فوروارد (F) و ریورس (R)	Tm	توالی (5'-3')
Beta-actin	F	61/66	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
	R	60/88	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
SSX2IP	F	59/06	AGACTTTTGCCAGACACGTTC
	R	57/24	AGGAGCATCCACTATAGCAAC
UBE2W	F	58/27	TAATGCCGTTACTGCCTGTG
	R	58/95	AGGAAACTGCGGAAGACTGA

جدول شماره 2: مواد و مقدار مصرفی آن‌ها در real time PCR

نام ژن	کیت SYBR Tag II	ddH_2O	پرایمر Forward	پرایمر Reverse	cDNA
UBE2W	5 µl	3/56 µl	0/22 µl	0/24 µl	1 µl
SSX2IP	5 µl	3/56 µl	0/22 µl	0/24 µl	1 µl
Beta-actin	5 µl	3/4 µl	0/3 µl	0/3 µl	1 µl

غلظت پرایمرها 10 پیکومول (pmol) و غلظت cDNA 10 نانوگرم (ng) می‌باشد.

یافته ها

نتایج مربوط به ارزیابی بیوانفورماتیکی

آنالیز بیوانفورماتیکی بر روی داده‌های بیان ژن موسوم به میکرو آرایه که از GEO تهیه شده بودند و حاصل مطالعه Ao و همکاران در سال 2019 بود، انجام شد(22). داده‌ها با کد دسترسی GSE132119 تهیه و مورد آنالیز قرار گرفتند. با توجه به این‌که تعداد ژن‌های مورد آنالیز به مراتب زیاد است، لذا در این مطالعه top 10 hub genes از بین چندین هزار ژن انتخاب شد و اساس این انتخاب میزان تاثیرپذیری ژن‌ها در پاسخ به ملاتونین می‌باشد. تاثیر ملاتونین بر میزان بیان top 10 hub genes متفاوت است، به طوری که ژن‌های *SSX2IP*، *FCAR*، *ARRDC3*، *UBE2W*، *BMM* بعد از تیمار سلول با ملاتونین افزایش بیان نشان می‌دهند. این در حالی است که بیان ژن‌های *WDR44*، *COTL1*، *DMKN*، *PLSCR1* و *ENAH* در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است.

از آن‌جایی‌که ژن‌های top 10 hub genes بیش‌ترین تاثیرپذیری را در بین چندین هزار ژن دارند، لذا به این منظور نمودار شبکه عصبی برای نشان دادن ارتباطشان با

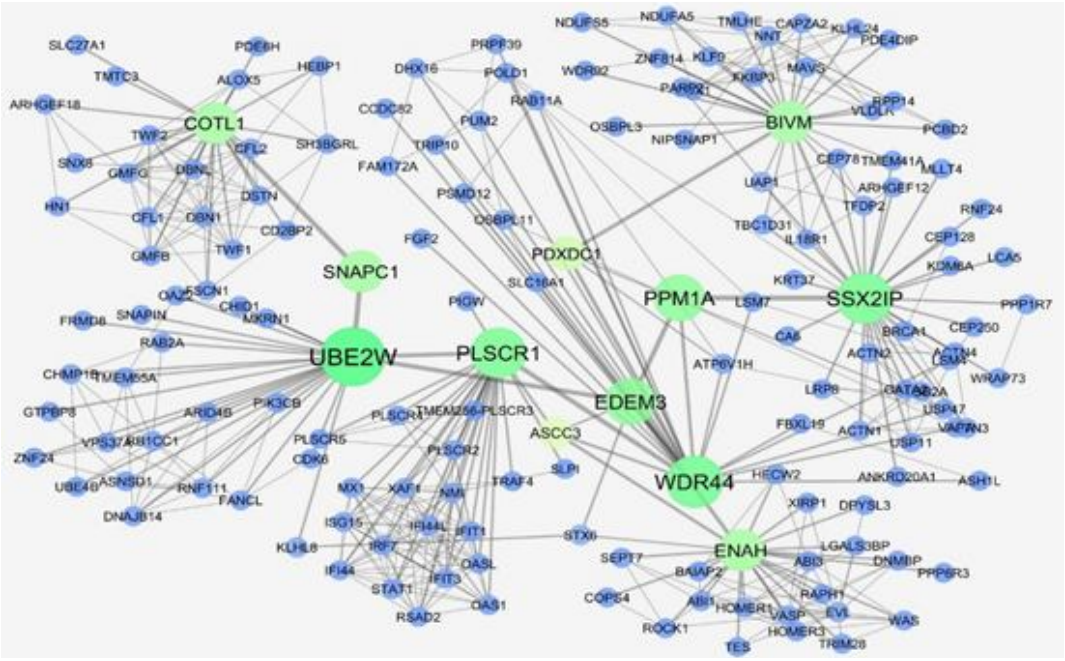
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

همدیگر و سایر ژن‌های عملکردی رسم شد. همان‌طور که نمایان است 10 ژن با نمره بالاتری دارای ارتباط گسترده با همدیگر و ژن‌های پایین دست این مجموعه هستند (تصویر شماره 1)، به استثنای ژن‌های *FCAR*، *ARRDC3*، که نه تنها با هیچ کدام از top 10 hub genes ارتباط ندارند بلکه با ژن‌های زیرمجموعه top 10 hub genes هم ارتباط برقرار نمی‌کنند. بنابراین از این 2 ژن برای ادامه مطالعات صرف نظر می‌شود.

تصویر شماره 2 ارتباط شبکه‌ای top 10 hubgenes به استثنای *FCAR*،*ARRDC3* را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج نشان تمام ژن‌ها با هم، با زیرمجموعه خود و زیرمجموعه سایر ژن‌ها ارتباط برقرار می‌کنند. لذا فاکتوری که برای انتخاب دو ژن برای ارزیابی آزمایشگاهی استفاده شده است، تعداد ارتباط هر کدام از top 10 hub genes با زیرمجموعه خود و با اعضای دیگر top 10 hub genes ها می‌باشد. از آن‌جایی که این فاکتورها در ژن‌های *SSX2IP* و *UBE2W* نسبت به سایر ژن‌ها بیش‌تر دیده می‌شود لذا ژن‌های مذکور برای مطالعات آزمایشگاهی انتخاب شدند (تصویر شماره 2).

نتایج سمیت سلولی

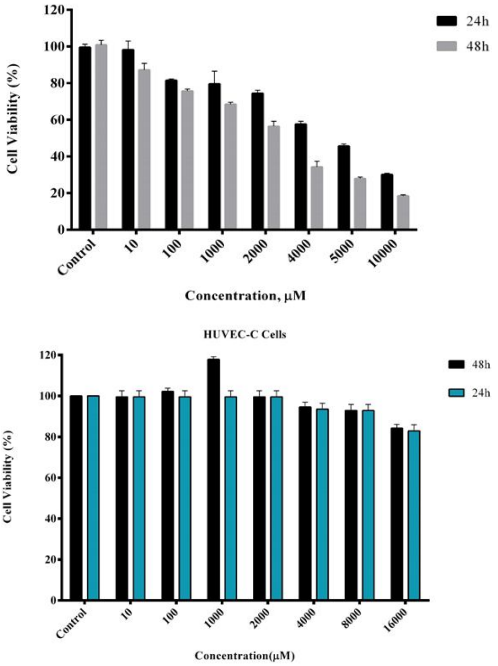
به دنبال مواجه شدن سلول‌های سرطانی HepG2 و سلول های نرمال HUVEC-C با غلظت‌های مختلفی از ملاتونین برای 24 و 48 ساعت، زنده مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل به تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) ندارند. این درحالی است صورت وابسته به غلظت و زمان درسلول‌های سرطانی HepG2 کاهش معنی‌داری ($P\leq0/05$) نشان داد(نمودار شماره a–1) ولی در سلول‌های نرمال HUVEC-C تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد($P>0/05$) (نمودار شماره b–1). مطابق نمودار نشان داده شده (نمودار شماره 1) میزان بقای سلول‌های HepG2 در گروه‌های تیمار شده با غلظت 10-100 µM نسبت به گروه کنترل در زمان‌های 24 و 48 ساعت، تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) ندارند. این در حالی است که با افزایش غلظت ملاتونین از 100 µM به 10000 µM



تصویر شماره 2: ارتباط top 10 hub genes با هر کدام از اعضای خودشان و ژن‌های زیر مجموعه را نشان می‌دهد. دو ژن *FCAR* و *ARRDC3* در این شبکه ارتباط ندارند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

میزان بقای سلولی به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافته است، به‌طوری‌که مهار 50 درصد زیستایی سلول‌ها (IC_{50}) در 24 و 48 ساعت به ترتیب برابر با 2780 µM و 2080 به‌دست آمد.

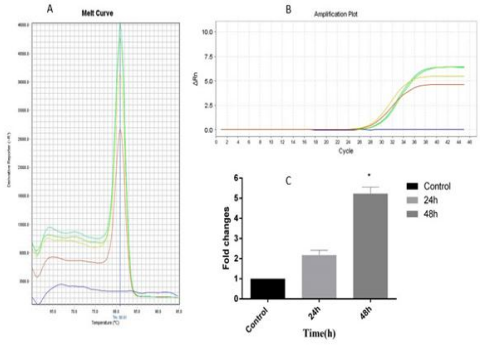


نمودار شماره 1. a): اثر سمیت سلولی ملاتونین(10-10000µM) بر روی رده سلول‌های سرطانی HeG2 در زمان‌های 24 و 48 ساعت را نشان می‌دهد (P<0/05). b) اثر سمیت سلولی ملاتونین (10-16000 µM) بر روی رده سلول‌های سالم HUVEC-C در زمان‌های 24 و 48 ساعت را نشان می‌دهد (P >0/05).

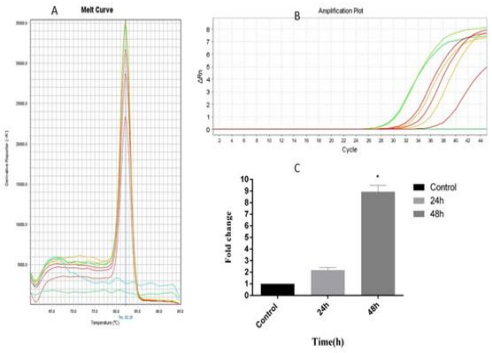
نتایج مربوط به Real-time PCR

نمودار شماره 2-C و نمودار شماره 3-C به ترتیب بیانگر میزان بیان نسبی ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* در مقایسه با ژن مرجع (β-actin) را در سلول‌های HepG2 تیمار شده با ملاتونین را (غلظت 2080 میکرومولار IC_{50} 48 ساعت) نشان می‌دهد.

داده‌های کمی درهر نمونه دربرابر β-actin نرمال‌سازی شد و بیان نسبی ژن‌های مرتبط با نمونه کنترل متناظر (گروه تیمار نشده)، که 100 درصد در نظر گرفته شد توسط روش $2^{-\Delta ct}$ محاسبه شد. نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* در 48 ساعت در مقایسه با β-actin به‌صورت معنی‌دار (P <0/05) افزایش می‌یابند. همچنین همان‌طورکه مشاهده می‌شود این افزایش بیان در 24 ساعت برای هر دو ژن در گروه‌های تیمار شده با ملاتونین در مقایسه با گروه شاهد هم مشاهده می‌شود ولی از نظر آماری غیرمعنی‌دار(P >0/05) است.



نمودار شماره 2: تاثیر پذیری بیان نسبی ژن *UBE2W* در سلول‌های سرطانی HepG2 مواجهه شده با ملاتونین 2080 میکرو مولار در زمان‌های 24 و 48 . A) دمای ذوب ژن‌ها. B) نمودار تکثیر ژن‌ها و C) بیان ژن *UBE2W* به روش (Real-time PCR P<0.05*).



نمودار شماره 3: تاثیر پذیری بیان نسبی ژن *SSX2IP* در سلول های سرطانی HepG2 مواجهه شده با ملاتونین 2080 میکرو مولار در زمان های 24 و 48 . A) دمای ذوب ژن ها. B) نمودار تکثیر ژن ها و C) بیان ژن *SSX2IP* به روش Real-time PCR (P<0.05*).

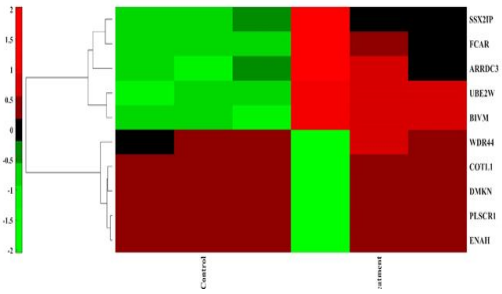
بحث

در مطالعه حاضر براساس بررسی مولفین برای اولین بار با استفاده از روش بیوانفورماتیکی ژن‌های *UBE2W*

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

و *SSX2IP* به عنوان ژن هدف ملاتونین در سلول‌های سرطانی HepG2 تیمار شده با ملاتونین پیش‌بینی شد و نتایج آزمایش تجربی هم راستا با پیش‌بینی نتایج بیوانفورماتیکی بود.

استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی داده‌های میکرو آرایه اطلاعات ارزشمندی در مورد میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه از جمله انکوژن‌ها، مهارکننده‌های توموری، فاکتورهای رونویسی، miRNA و siRNA در انواع سرطان‌ها ارایه می‌دهد. جهت طراحی داروی مناسب برای انواع سرطان‌ها مطالعات گسترده‌ای بر روی ژن‌های کنترل‌کننده رشد سلولی در حال انجام می‌باشد، با این حال تشخیص ژن‌های هدف داروها (از جمله انکوژن‌ها و ژن‌های مهارکننده تومور) با استفاده از روش تجربی سنتی مشکل و زمان بر است(22). بدین‌منظور در مطالعه حاضر از آنالیز بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی ژن‌های مهم (ژن هدف) بعد از مواجه شدن سلول‌های سرطانی HepG2 با ملاتونین استفاده شد. نتایج نشان داد که ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* با بیش‌ترین افزایش بیان و تاثیرپذیری ژن‌های هدف ملاتونین هستند (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 3: میزان بیان ژن‌های top 10 hub genes را در سلول‌های HepG2 تیمار شده با ملاتونین که به روش بیوانفورماتیکی آنالیز شده است را نشان می‌دهد. میزان بیان ژن بین اعداد 2- تا 2+ می‌باشد که با رنگ‌های قرمز (بیش‌ترین بیان) تا سبز (کم‌ترین بیان) نشان داده شده است.

ارتباط گسترده این ژن‌ها با هر کدام از ژن‌های top 10 hub genes و یا ژن‌های زیرمجموعه خود می‌تواند توجیه قابل قبولی برای نتایج بدست آمده باشد (تصویر شماره 2). هم راستا با مطالعه حاضر، عابدی و همکاران در سال 1398 با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف *HMGA2* shRNA را پیش‌بینی کردند و با یافته‌های آزمایشگاهی نتایج به‌دست آمده را تایید کردند(23). در پژوهشی دیگر Chen و همکاران در سال 2018 با تعریف دو الگوریتم بیوانفورماتیکی (protein-protein interaction network و network diffusion) ژن‌های جدید مهارکننده توموری را (به عنوان ژن‌های هدف) مشخص کردند(24). در بخش تجربی این مطالعه که برای تایید یافته‌های بیوانفورماتیکی انجام شد، ابتدا سمیت سلولی ملاتونین روی سلول‌های سرطانی HepG2 ارزیابی شد و نتایج نشان داد که ملاتونین، زنده مانی سلول‌ها را به‌صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش می‌دهد.

در پژوهشی Zhelev و همکاران در سال 2017 بیان کردند که ملاتونین به تنهایی سمیت سلولی متوسط را بر علیه لوکمی لنفوسیت نشان می‌دهد، اما بعد از ترکیب آن با داروهای جدید ضد سرطانی، میزان سمیت سلولی به شدت افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده اثر هم افزایی آن با سایر داروها است(25).

در مطالعه دیگری Yun و همکاران در سال 2016 گزارش کردند که مواجهه شدن سلول‌های SK-BR-3 و MDA-MB-231 (به عنوان مدل سرطان سینه) با غلظت‌های مختلف از ملاتونین منجر به کاهش معنی‌دار زیستایی سلول‌ها می‌شود و این اثر وابسته به غلظت بود که می‌تواند تاییدی بر یافته مطالعه حاضر باشد(26). در مطالعات دیگری اثر ملاتونین بر زنده مانی سلول های HepG2 مورد ارزیابی قرار گرفته است(27)، که طی آن Osseni و همکاران درسال 2000 مشاهده کردند، IC50 ملاتونین در 72 ساعت حدود 5000 µM می‌باشد(28،27). این نتیجه در مقایسه با IC50 به‌دست آمده از مطالعه حاضر (IC50 2080 µM در 48 ساعت) بیش‌تر می‌باشد. همچنین در مطالعه Lina Mi و همکاران در سال 2020،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

IC50 به‌دست آمده برای ملاتونین بر روی سلول های HepG2 ، 2/3 mM در 72 ساعت می باشد(29).

ارزیابی میزان بیان ژن‌های UBE2W و SSX2IP با دستگاه Real-time PCR در سلول‌های HepG2 تیمار شده با ملاتونین نشان داد که میزان بیان نسبی هر دو ژن به‌صورت وابسته به زمان افزایش می‌یابد و این یافته هم راستا با پیش بینی حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی است. نقش ژن UBE2W در سرطان‌های مختلف به خوبی مشخص نشده است، اما می‌توان نقش آن‌ها را در مطالعات دیگر مورد اشاره قرار داد. چندین مطالعه نقش ژن SSX2IP را در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان خون مورد مطالعه قرار داده‌اند وپیشنهاد کرده‌اند که این ژن می‌تواند به عنوان یکی از ژن‌های هدف درمانی به کار گرفته شود(19،30،31) که در پژوهش حاضر برای اولین بار تاثیرپذیری این ژن‌ها از ملاتونین مورد مطالعه قرار گرفته است، لذا مقایسه نتایج تجربی این مطالعه با پژوهش‌های قبلی امکان‌پذیر نمی‌باشد. از آن‌جایی که داده‌های میکرو آرایه مورد استفاده برای آنالیز بیوانفورماتیکی درپژوهش حاضر مربوط به تیمار سلول‌های HepG2 با ملاتونین و مربوط به مطالعه‌ای انجام شده در گذشته می‌باشد، لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی از داده‌های میکرو آرایه استخراج شده از آزمایش تجربی همان مطالعه استفاده شود، تا مقایسه نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی با نتایج تجربی به‌صورت کامل‌تر مشخص شود. درمطالعه حاضر تنها دو ژن از بین top 10 hub genes به‌عنوان ژن‌های هدف ملاتونین جهت مقایسه با یافته‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرارگرفت و این محدویت آشکار در مطالعه حاضر می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، تمام ژن‌های مهم انتخاب شده در آنالیز بیوانفورماتیکی در مدل تجربی نیز ارزیابی شود تا نتیجه مقایسه آنالیز بیوانفورماتیکی و تجربی به صورت شفاف مشخص گردد. به‌طورکلی نتایج حاصل از مطالعه بیوانفورماتیکی و تجربی نشان داد که ژن‌های *UBE2W* و *SSX2IP* به عنوان ژن‌های هدف ملاتونین هستند، اگر چه این یافته نیاز به مطالعات گسترده دارد.

سپاسگزاری

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه تبریز به شماره IR.TABRIZU.REC.1398.015 به تصویب رسیده است. بدینوسیله از همکاران آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه تبریز که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند تشکر می کنیم.

References

1. Whang-Peng J, Cheng A-L, Hsu C, Chen C-M. Clinical development and future direction for the treatment of hepatocellular carcinoma. J Experiment Clin Med 2010; 2(3): 93-103.
2. Wörns MA, Galle PR. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. Dig Liver Dis 2010; 42(Supple 3): S302-S309.
3. Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. Appl Matertoday 2018; 12: 177-190.
4. Ghaffari M, Dehghan G, Abedi-Gaballu F, Kashanian S, Baradaran B, Ezzati Nazhad Dolatabadi J, et al. Surface functionalized dendrimers as controlled-release delivery nanosystems for tumor targeting. Eur J Pharm Sci 2018; 122: 311-330.
5. Anisimov VN. The role of pineal gland in breast cancer development. Crit Rev Oncol Hematol 2003; 46(3): 221-234.
6. Zare H, Shafabakhsh R, Reiter RJ, Asemi Z. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer: molecular aspects. J Ovarian Res 2019; 12(1): 26.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

7. da Silva NRJ, Laste G, Deitos A, Stefani LC, Cambraia-Canto G, Torres IL, et al. Combined neuromodulatory interventions in acute experimental pain: assessment of melatonin and non-invasive brain stimulation. Fron Behav Neurosci 2015; 9: 77.
8. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. Mol Cell Endocrinol 2012; 351(2): 152-166.
9. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. Mol Cell Biochem 2019; 462(1-2): 133-155.
10. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat J-H, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. J Biol Chem 1994; 269(46): 28531-28534.
11. Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. CA Cancer J Clin 1994; 44(3): 160-170.
12. Pranavathiyani G, Thanmalagan RR, Devi NL, Venkatesan A. Integrated transcriptome interactome study of oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer. Gene Dis 2019; 6(1): 78-87.
13. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. Science 2010; 330(6009): 1340-1344.
14. Devor EJ, Cha E, Warrier A, Miller MD, Gonzalez-Bosquet J, Leslie KK. The mir-503 cluster is coordinately under-expressed in endometrial endometrioid adenocarcinoma and targets many oncogenes, cell cycle genes, Dna repair genes and chemotherapy response genes. OncoTargets Ther 2018; 11: 7205-7211.
15. Wang B, Merillat SA, Vincent M, Huber AK, Basrur V, Mangelberger D, et al. Loss of the ubiquitin-conjugating enzyme UBE2W results in susceptibility to early postnatal lethality and defects in skin, immune, and Male reproductive systems. J Biol Chem 2016; 291(6): 3030-3042.
16. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. Science 2015; 348(6230): 74-80.
17. Hosseini SM, Okoye I, Chaleshtari MG, Hazhirkarzar B, Mohamadnejad J, Azizi G, et al. E2 ubiquitin-conjugating enzymes in cancer: Implications for immunotherapeutic interventions. Clin Chim Acta 2019.
18. Knipscheer P, Räschle M, Smogorzewska A, Enoiu M, Schärer OD, Elledge SJ, et al. The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. Science 2009; 326(5960): 1698-1701.
19. Breslin A, Denniss FA, Guinn B-a. SSX2IP: an emerging role in cancer. Biochem Biophys Res Commun 2007; 363(3): 462-465.
20. Smith HA, McNeel DG. The SSX family of cancer-testis antigens as target proteins for tumor therapy. Clin Dev Immunol 2010; 2010.
21. Wasserman PD. Advanced methods in neural computing. New Jersey: John Wiley & Sons; 1993.
22. Ao L, Li L, Sun H, Chen H, Li Y, Huang H, et al. Transcriptomic analysis on the effects of melatonin in gastrointestinal carcinomas. BMC Gastroenterol 2020; 20(1): 1-11.
23. Jiang Z, Zhou Y. Using bioinformatics for drug target identification from the genome. Am J Pharmacogenomics 2005; 5(6): 387-396.
24. Abedi Gaballu F, Dehghan G, Mansoori B. study of hmga2 gene inhibition with specific shrna and sirna and investigation of corresponding effects on downstream gene

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]

expression in mda-mb-231 cancer cells: a bioinformatic and experimental study. Stud Med Sci 2019; 30(6): 475-486 (Persian).

25. Chen L, Zhang Y-H, Zhang Z, Huang T, Cai Y-D. Inferring novel tumor suppressor genes with a protein-protein interaction network and network diffusion algorithms. Mol Ther Methods Clin Dev 2018; 10: 57-67.
26. Zhelev Z, Ivanova D, Bakalova R, Aoki I, Higashi T. Synergistic cytotoxicity of melatonin and new-generation anticancer drugs against leukemia lymphocytes but not normal lymphocytes. Anticancer Res 2017; 37(1): 149-159.
27. Yun S-M, Woo SH, Oh ST, Hong S-E, Choe T-B, Ye S-K, et al. Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of Redd1 expression in breast cancer cells. Mol cell Endocrinol 2016; 422: 64-73.
28. Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. Life sci 2000; 68(4): 387-399.
29. Mi L, Kuang H. Melatonin Regulates Cisplatin Resistance and Glucose Metabolism Through Hippo Signaling in Hepatocellular Carcinoma Cells. Cancer Manag Res 2020; 12: 1863-1874.
30. Li P, Chen X, Su L, Li C, Zhi Q, Yu B, et al. Epigenetic silencing of miR-338-3p contributes to tumorigenicity in gastric cancer by targeting SSX2IP. PLoS One 2013; 8(6): e66782.
31. Li P, Lin Y, Zhang Y, Zhu Z, Huo K. SSX2IP promotes metastasis and chemotherapeutic resistance of hepatocellular carcinoma. J Translat Med 2013; 11(1): 52.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-09]