

CTGF and MLH1 Gene Expression Levels in Colorectal Cancer Tumor Tissues and Adjacent Normal Tissues in Patients in Golestan Province

Amin Lotfvarzi¹,
Farkhondeh Nemati²

¹ MSc in Genetics, Department of Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

(Received October 15, 2022 ; Accepted February 20, 2023)

Abstract

Background and purpose: Colorectal cancer is the third most common type of cancer in terms of incidence and the second most common cause of cancer-related death worldwide. The aim of this study was to investigate the expression of *CTGF* and *MLH1* gene in colorectal cancer tumor tissues and adjacent normal tissues in patients in Golestan province.

Materials and methods: In this experimental study, 20 colorectal cancer tissue samples and 20 adjacent healthy tissue samples were collected from Sayad Shirazi Hospital Research Center, Gorgan. After RNA extraction, cDNA synthesis and primer design, the expression of *CTGF* and *MLH1* genes were measured by Real Time PCR. Statistical analysis of data was done in Graphpad Prism software.

Results: According to findings, increase was seen in the *CTGF* gene expression level in tumor tissue to the adjacent healthy tissue ($P<0.05$), while the ratio of the *MLH1* gene expression in the tumor tissue to the adjacent healthy tissue decreased ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that increased expression levels of *CTGF* gene and decreased expression levels of *MLH1* gene play roles in colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, gene expression, *CTGF*, *MLH1*, Golestan province

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (218): 80-86 (Persian).

Corresponding Author: Farkhondeh Nemati - Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.
(E-mail: farkhondehnemati@gmail.com)

بررسی بیان ژن *CTGF* و *MLH1* در بافت‌های توموری افراد مبتلا به سرطان کلورکتال و بافت‌های نرمال مجاور آن در جمعیتی از مبتلایان استان گلستان

امین لطف ورزی¹

فرخنده نعمتی²

چکیده

سابقه و هدف: سرطان کلورکتال سومین نوع شایع سرطان از نظر بروز و سومین نوع سرطان از نظر مرگ و میر در سراسر جهان گزارش شده است. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن *MLH1* و *CTGF* در بافت‌های توموری افراد مبتلا به سرطان کلورکتال و بافت‌های نرمال مجاور آن در جمعیتی از مبتلایان استان گلستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، 20 نمونه بافت سرطانی کلورکتال و 20 نمونه بافت سالم مجاور آن، از مرکز تحقیقات بیمارستان صیاد شیرازی گرگان جمع‌آوری شدند. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA و طراحی پرایمر، بیان ژن‌های *MLH1* و *CTGF* با روش Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت و آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار گراف پد پریسم انجام شد.

یافته‌ها: نسبت بیان ژن *CTGF* در بافت تومور به بافت سالم مجاور آن افزایش داشته است ($P < 0/05$)، در حالی که نسبت بیان ژن *MLH1* در بافت تومور به بافت سالم مجاور آن کاهش داشته است ($P < 0/05$).

استنتاج: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، ژن *CTGF* با افزایش بیان و ژن *MLH1* با کاهش بیان، در بروز سرطان کلورکتال نقش ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان کلورکتال، بیان ژن، *CTGF*، *MLH1*، استان گلستان

مقدمه

رشد بافت همبند (*CTGF*)، اولین بار توسط Bradham و همکاران کشف شد (3). پس از آن، گروه‌های مختلف تایید کرده‌اند که *CTGF* می‌تواند توسط سلول‌های مختلف مانند فیبروبلاست‌ها، سلول‌های تومور و سلول‌های ماهیچه‌ای تولید شود (4-8) *CTGF* از چهار دمین مدولار (Modular Protein Domains) تشکیل شده است. این

تحقیقات نشان می‌دهد سرطان روده بزرگ و راست روده در بین سرطان‌های موجود در رتبه سوم قرار دارد و آمارها آن را سومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان می‌دانند (1). این امر نشان‌دهنده این موضوع است که باید روش‌های مولکولی در زمینه پیش‌آگهی و مطالعه روند پیشرفت این سرطان صورت پذیرد (2). فاکتور

E-mail: farkhondehnemati@gmail.com

مؤلف مسئول: فرخنده نعمتی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، دانشکده علوم پایه

1. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

2. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

تاریخ دریافت: 1401/7/23 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/9/30 تاریخ تصویب: 1401/12/1

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آزادسازی با شناسه اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1401.025 به تصویب رسید.

جدول شماره 1: مشخصات بیماران

ویژگی	تعداد (درصد)
جنسیت بیماران	مرد 8 (30)
	زن 12 (70)
میانگین سنی	61
رنج سنی	45-84
بافت شناسی	آدنوکارسینوما
درجه (Grade)	I (65)
	II (10)

استخراج RNA

استخراج RNA، با استفاده از محلول تریزول شرکت سلول گسترکارا ژن (ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. هم چنین جهت بررسی کمی RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ، جذب نوری نمونه (OD) در طول موج 260 تقسیم بر جذب نوری نمونه در طول موج 280 خوانده شد و نمونه های با جذب 1/5 تا 2 انتخاب شدند. RNAهای استخراج شده بلافاصله برای انجام مرحله نسخه برداری معکوس و ساخت و تولید cDNA توسط کیت شرکت پارس طوس براساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. نمونه ها برای ادامه مراحل کار در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

طراحی پرایمر

پرایمرها جهت تکثیر بخشی از قطعات مورد نظر ژن های *CTGF*, *MLH1*, *β2M* توسط نرم افزار gene runner طراحی گردید (جدول شماره 2).

جدول شماره 2: توالی آغازگرهای طراحی شده ژن های *CTGF*,

<i>β2M</i> , <i>MLH1</i>	
نام ژن	توالی آغازگرها
<i>CTGF</i>	برای پرایمر پیشرو: CTGGAAGAGAACATTAAGAAGGGCA برای پرایمر معکوس: TGATAGGCCTGGAGATTTGGGAG
<i>MLH1</i>	برای پرایمر پیشرو: TCAGGTTATCGGAGCCAGCAC برای پرایمر معکوس: CCAATCTCCCTGTCAGCCAC
<i>β2M</i>	برای پرایمر پیشرو: AGATGAGTATGCTGCCGTGT برای پرایمر معکوس: TGCGACATCTCAAACCTCCAT

دمین ها، عملکردهای مختلفی را، با تاثیر بر روی فاکتورهای مختلف از جمله گیرنده های سطح سلولی، سیتوکین ها و پروتئین های ماتریکس خارج سلول انجام می دهد (9). مهم تر از همه این عملکردها، *CTGF* سهم بسزایی در پاتوژنز و پیشرفت بیماری هایی مانند سرطان کولورکتال دارد (10). ژن *MLH1* عضوی از گروهی از ژن ها به نام ژن های ترمیم عدم تطابق (MMR or mismatch repair) است که مسئول تشخیص و ترمیم خطاهای DNA است که در طول همانندسازی DNA رخ می دهد (11). مشخص شد که هایپرمتیلاسیون ژن *MLH1* با خاموش شدن این ژن یا از دست دادن پروتئین *MLH1*، ارتباط دارد و یک فنوتیپ مولکولی مشخص به نام ناپایداری ریزماهواره (MSI or Microsatellite instability) را تحریک می کند که نوعی بی ثباتی ژنتیکی را نشان می دهد (12، 13). مطالعات نشان می دهند که *MLH1* در سایر فعالیت های اصلی سلولی از جمله تنظیم نقاط بازرسی چرخه سلولی، آپوپتوز و نو ترکیبی متقاطع نقش دارد (14، 15). اخیر نشان داده اند که هر گونه تغییر در بیان ژن *MLH1* ممکن است خطر سرطان کولورکتال را افزایش دهد (16، 17). هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن *CTGF* و *MLH1* در بافت های توموری افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و بافت های نرمال مجاور آن در جمعیتی از مبتلایان استان گلستان است.

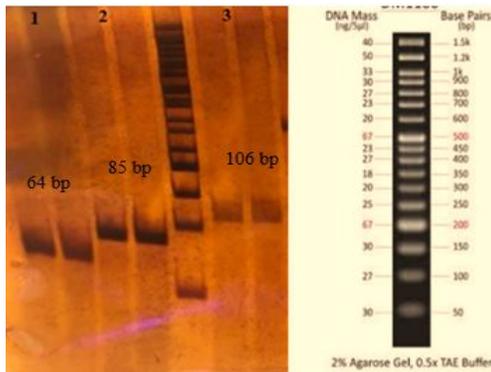
مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، تعداد 20 نمونه بافت توموری کولون و 20 نمونه بافت سالم مجاور آن (جمعا 40 بافت تازه جراحی) از مرکز تحقیقات بیمارستان صیاد شیرازی گرگان تهیه شد. گروه مطالعه شامل بیمارانی بودند که نتیجه کولونوسکوپی آنها مثبت بود و توسط پزشک متخصص تایید شده بودند و هنوز هیچ درمانی شامل درمان های شیمی درمانی و پرتو درمانی برای آنها انجام نشده بود (جدول شماره 1). مطالعه حاضر در

واکنش Real Time PCR

بررسی تکثیر اختصاصی محصولات Real-Time PCR به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده و حصول اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و پرایمر دایمر، محصولات نهایی حاصل از Real-Time PCR، بر روی ژل پلی آکریل آمید 2 درصد بارگذاری و الکتروفورز شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ژن $\beta 2M$ باند 106 جفت بازی (bp)، ژن $MLHI$ باند 85 جفت بازی (bp) و هم چنین ژن $CTGF$ باند 64 جفت بازی (bp) تک باند بر روی ژل پلی آکریل آمید دارد و پرایمرهای طراحی شده برای این سه ژن اختصاصی عمل می کنند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: بررسی تکثیر اختصاصی محصولات Real-Time PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید. شماره 1 مربوط به ژن $CTGF$ با طول 64 جفت باز، شماره 2 مربوط به ژن $MLHI$ با طول 85 جفت باز، شماره 3 مربوط به ژن $\beta 2M$ با طول 106 جفت باز

برای اندازه گیری بیان ژن $CTGF, MLHI, \beta 2M$ تکثیر ژن توسط واکنش Real time PCR با استفاده از کیت سایبر گرین (Syber Green) شرکت پیشگام بیوتک (ایران) انجام شد. تعیین کمیت نسبی به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبر گرین انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR در جدول شماره 3 و برنامه حرارتی برای تکثیر ژن ها در جدول شماره 4 نشان داده شده است. از $\beta 2M$ به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. منحنی های استاندارد نسبی با رقت های سریال تولید شده و همه نمونه ها در سه نسخه اجرا شدند. توالی آغازگرهای PCR در جدول شماره 2 ذکر شده است. منحنی ذوب به وسیله اندازه گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمان های مختلف رسم شد. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Relative Quantitative Real time PCR، داده های خام به صورت CT از دستگاه استخراج شد. داده های CT برای تعیین مقدار هر ژن mRNA/ موجود نسبت به هر نمونه استفاده و تغییر نسبی برابر سطح RNA هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها مانند t-test با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم ترسیم گردید. مقدار $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره 3: مواد و حجم های مورد نیاز آماده سازی نمونه ها

جهت انجام Real-Time PCR	
مواد مورد نیاز	حجم مورد نیاز در هر واکنش
RealQ plus 2x Master Mix	12/5 μ l
Primer A (10 μ M)	0/5 μ l
Primer B (10 μ M)	0/5 μ l
PCR Grade H ₂ O	10/5 μ l
Template DNA (cDNA)	1 μ l
حجم نهایی	25 μ l

جدول شماره 4: چرخه دمایی و زمان به کار رفته در تکنیک

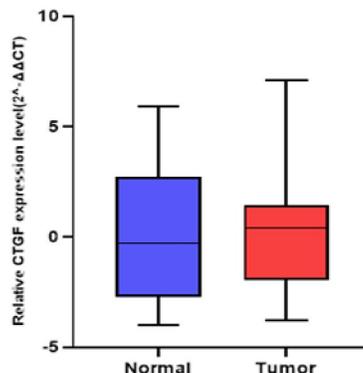
Real-Time PCR		
Cycles	Duration of Cycles	Temperature
1	15 minutes	95 °C
25-35	15-30 Seconds	95 °C
	60 Seconds	55-60 °C

یافته ها و بحث

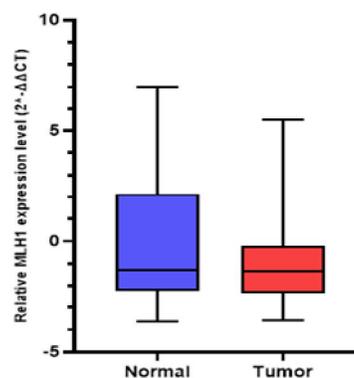
در این مطالعه میزان بیان ژن $CTGF$ در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور افزایش (نمودار شماره 1) و میزان بیان ژن $MLHI$ کاهش یافته است (نمودار شماره 2). هم چنین طبق بررسی های چند برابری (Fold Change)، بیان ژن $CTGF$ در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور، 1/41 برابر افزایش ($P < 0/05$) (نمودار شماره 1) و بیان ژن $MLHI$ در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور، 0/22 برابر کاهش ($P < 0/05$) داشته است (نمودار شماره 2).

طبق مطالعات Guo و Zhang و Lun و Ladwa، سطح بیان ژن CTGF در نمونه های توموری افزایش پیدا می کند (20-23). در پژوهش حاضر نیز، بیان ژن CTGF در نمونه های توموری سرطان کولورکتال نسبت به نمونه های سالم مجاور آن، بیش تر بوده است ($P < 0/05$).

Pinto و همکاران نیز در سال 2018، مؤثر بودن متیلاسیون MLH1 برای تشخیص سندروم لینچ (Lynch syndrome) (سرطان کولورکتال غیرپولیپی ارثی) در بیماران مبتلا به تومور با کاهش بیان MLH1 را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش بیان کاهش یافته RNA در موارد متیلاسیون پر موثر MLH1 در مقایسه با گروه کنترل نشان داده شد (24). پژوهش فوق با مطالعه حاضر همخوانی دارد زیرا در مطالعه حاضر نیز، کاهش بیان ژن MLH1 در نمونه های سرطانی کولورکتال نسبت به نمونه های سالم مجاور آن دیده شده است ($P < 0/05$). در این مطالعه، بیان ژن CTGF در نمونه های سرطانی نسبت به نمونه های سالم مجاور آن افزایش و بیان ژن MLH1 در نمونه های سرطانی نسبت به نمونه های سالم مجاور آن کاهش یافته است. با انجام آزمایش های مشابه با تکنیک های نوین و کارآمدتر و بررسی جامعه آماری گسترده تر می توان از صحت یافته های کنونی اطمینان حاصل نمود و ژن های مذکور به عنوان بیومارکر تشخیصی، جهت تشخیص زودهنگام سرطان کولورکتال و پیگیری روند بیماری در نظر گرفته شوند. به امید آن که در آینده ای نزدیک، این بیومارکرها بتوانند در بهبود وضعیت تشخیص و درمان سرطان شایع کولورکتال نقش داشته باشند.



نمودار شماره 1: میزان بیان ژن CTGF طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$



نمودار شماره 2: میزان بیان ژن MLH1 طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$

ژن CTGF مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تکثیر تومور را فعال می کند. به عنوان مثال، گزارش شده است که CTGF چسبندگی کانونی کیناز SRC/فاکتور هسته ای کاپا B-p65 (سیگنال دهی FAK/SRC/NF-kB) را فعال می کند، که منجر به تنظیم مثبت سطح بیان ژن GLUT3 می شود و با اتصال مستقیم به گیرنده اینتگرین، تکثیر سلول های تومور را تسریع می کند (18، 19).

References

1. Siegel R.L, Miller K.D, Fuchs, H.E, Jemal A. Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin 2022; 72(1): 7-33.
2. O'Connell JB, Maggard MA, Livingston EH, Yo CK. Colorectal cancer in the young. Am J Surgery 2004; 187(3): 343-348.
3. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol 1991; 114(6): 1285-1294.

4. Makino Y, Hikita H, Kodama T, Shigekawa M, Yamada R, Sakamori R, et al. CTGF mediates tumorestroma interactions between hepatoma cells and hepatic stellate cells to accelerate HCC progression. *Cancer Res* 2018; 78(17): 4902-4914.
5. Mulsow JJW, Watson RWG, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Transforming growth factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. *Ann Surg* 2005; 242(6): 880-889.
6. Pan LH, Yamauchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, et al. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J* 2001; 17(6): 1220-1227.
7. Shen YW, Zhou YD, Luan X, Zhang WD. Blocking CTGF-mediated tumor-stroma interplay in pancreatic cancer. *Trends Mol Med* 2020; 26(12): 1064-1067.
8. Vial C, Zuniga LM, Cabello-Verrugio C, Canon P, Fadic R, Brandan E. Skeletal muscle cells express the profibrotic cytokine connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), which induces their dedifferentiation. *J Cell Physiol* 2008; 215(2): 410-421.
9. Chen Z, Zhang N, Chu HY, Yu Y, Zhang ZK, Zhang G, et al. Connective tissue growth factor: from molecular understandings to drug discovery. *Front Cell Dev Biol* 2020; 29(8): 593269.
10. Kubota S, Takigawa M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2015; 128(3): 181-196.
11. Grandval P, Fabre AJ, Gaildrat P, Baert-Desurmont S, Buisine M-P, Ferrari A, et al. UMD-MLH1/MSH2/MSH6 databases: description and analysis of genetic variations in French Lynch syndrome families. *Database (Oxford)* 2013; 2013: bat036.
12. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2073-2087.
13. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(20): 3219-3226.
14. Hinrichsen I, Ernst BP, Nuber F, Passmann S, Schäfer D, Steinke V, et al. Reduced migration of MLH1 deficient colon cancer cells depends on SPTAN1. *Mol Cancer* 2014; 13(1): 11.
15. Wu Q, Vasquez KM. Human MLH1 protein participates in genomic damage checkpoint signaling in response to DNA interstrand crosslinks, while MSH2 functions in DNA repair. *PLoS Genet* 2008; 4(9): e1000189.
16. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P DP. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2015; 34(3): 1087-1096.
17. Zarandi A, Irani S, Savabkar S, Chaleshi V, Ghavideldarestani M, Mirfakhraie R, et al. Evaluation of promoter methylation status of MLH1 gene in Iranian patients with colorectal tumors and adenoma polyps. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017; 10(Suppl 1): S117-S121.
18. Kim H, Son S, Ko Y, Shin I. CTGF regulates cell proliferation, migration, and glucose metabolism through activation of FAK signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2021; 40(15): 2667-2681.
19. Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Chen ZQ. Lipoxin A4 inhibits proliferation of human

- lung fibroblasts induced by connective tissue growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34(1): 65-72.
20. Guo Y, Li X, Lin C, Zhang Y, Hu G, Zhou J, et al. MicroRNA 133b inhibits connective tissue growth factor in colorectal cancer and correlates with the clinical stage of the disease. *Mol Med Rep* 2015; 11(4): 2805-2812.
21. Zhang SD, McCrudden CM, Yuen HF, Leung KL, Hong WJ, Kwok HF. Association between the expression levels of TAZ, AXL and CTGF and clinicopathological parameters in patients with colon cancer. *Oncol Lett* 2016; 11(2): 1223-1229.
22. Lun W, Wu X, Deng Q, Zhi F. MiR-218 regulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via targeting CTGF. *Cancer Cell* 2018; 18: 83.
23. Ladwa R, Pringle H, Kumar R, West K. Expression of CTGF and Cyr61 in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2011; 64(1): 58-64.
24. Pinto D, Pinto C, Guerra J, Pinheiro M, Santos R, Vedeld HM, et al. Contribution of MLH 1 constitutional methylation for Lynch syndrome diagnosis in patients with tumor MLH 1 downregulation. *Cancer Med* 2018; 7(2): 433-444.