BRIEF REPORT

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

Amin Lotfvarzi[1],
Farkhondeh Nemati[2]

[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 expresion 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 218 اسفند سال 1401 (86-80)

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 ورزی[1]

فرخنده نعمتی[2]

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 *CTGF* و *MLH1* 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 *CTGF* و *MLH1* 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.

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

مقدمه

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 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(8-4) *CTGF* از چهار دمین مدولار (Modular Protein Domains) تشکیل شده است. این

مولف مسئول: فرخنده نعمتی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، دانشکده علوم پایه E-mail: farkhondehnemati@gmail.com

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

2. استادیار، گروه زیست شناسی، 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

دمین‌ها، عملکردهای مختلفی را، با تاثیر بر روی فاکتورهای مختلف از جمله گیرنده‌های سطح سلولی، سیتوکین‌ها و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلول انجام می‌دهد(9). مهم‌تر از همه این عملکردها، *CTGF* سهم بسزایی در پاتوژنز و پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان کلورکتال دارد(10). ژن *MLH1* عضوی از گروهی از ژن‌ها به نام ژن‌های ترمیم عدم تطابق (MMR or mismatch repair) است که مسئول تشخیص و ترمیم خطاهای DNA است که در طول همانندسازی DNA رخ می‌دهد(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 می‌کند که نوعی بی‌ثباتی ژنتیکی را نشان می‌دهد(۱۳،۱۲). مطالعات نشان می‌دهند که *MLH1* در سایر فعالیت‌های اصلی سلولی از جمله تنظیم نقاط بازرسی چرخه سلولی، آپوپتوز و نوترکیبی متقاطع نقش دارد(۱۵،۱۴). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که هرگونه تغییر در بیان ژن *MLH1* ممکن است خطر سرطان کلورکتال را افزایش دهد(۱۷،۱۶). هدف از این مطالعه، 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 است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، تعداد 20 نمونه بافت توموری کولون و 20 نمونه بافت سالم مجاورآن (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 درمان‌های شیمی درمانی و پرتو درمانی برای آن‌ها انجام نشده بود (جدول شماره 1). مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آزادساری با شناسه اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1401.025 به‌تصویب 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 ازمحلول ترایزول شرکت سلول گستر کارا ژن (ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد. هم‌چنین 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 موج280 خوانده شد و نمونه‌های با جذب 1/5 تا 2 انتخاب شدند. RNAهای استخراج شده بلافاصله برای انجام مرحله نسخه‌برداری معکوس و ساخت و تولید cDNA توسط کیت شرکت پارس طوس براساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها برای ادامه مراحل کار در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

طراحی پرایمر

پرایمرها جهت تکثیر بخشی از قطعات موردنظر ژن‌های *CTGF*,*MLH1*,β2M توسط نرم‌افزار gene runner طراحی گردید (جدول شماره 2).

جدول شماره 2: توالی آغازگرهای طراحی شده ژن‌های *CTGF*، *MLH1*، *β2M*

نام ژن	توالی اغازگرها	طول قطعه	دمای اتصال
CTGF	پرایمر پیشرو: CTGGAAGAGAACATTAAGAAGGGCA پرایمر معکوس: TGATAGGCTTGGAGATTTTGGGAG	64Bp	60
MLH1	پرایمر پیشرو: TCAGGTTATCGGAGCCAGCAC پرایمر معکوس: CCATCTTCCTCTGTCCAGCCAC	85Bp	62
β2M	پرایمر پیشرو: AGATGAGTATGCCTGCCGTGT پرایمر معکوس: TGCGACATCTTCAAACCTCCAT	106Bp	61

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

واکنش Real Time PCR

برای اندازه‌گیری بیان ژن *CTGF,MLH1,β2M* تکثیر ژن توسط واکنش Real time PCR با استفاده از کیت سایبرگرین (Syber Green) شرکت پیشگام بیوتک (ایران) انجام شد. تعیین کمیت نسبی به‌وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR در جدول شماره3 و برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌ها در جدول شماره 4 نشان داده شده است. از *β2M* به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. منحنی‌های استاندارد نسبی با رقت‌های سریال تولید شده و همه نمونه‌ها در سه نسخه اجرا شدند. توالی آغازگرهای PCR در جدول شماره 2 ذکر شده است. منحنی ذوب به‌وسیله اندازه‌گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمان‌های مختلف رسم شد. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Relative Quantitative Real time PCR، داده‌های خام به‌صورت CT از دستگاه استخراج شد. داده‌های 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 داده‌ها مانند t_test با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریسم ترسیم گردید. مقدار P<0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره 3: مواد و حجم‌های مورد نیاز آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام Real_Time PCR

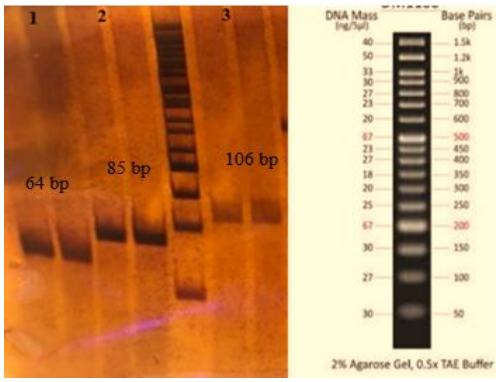
مواد مورد نیاز	حجم مورد نیاز در هر واکنش
RealQ plus 2x Master Mix	12/5 µl
Primer A(10µM)	0/5 µl
Primer B(10µM)	0/5 µl
PCR Grade H2o	10/5 µl
Template DNA(cDNA)	1 µl
حجم نهایی	25 µl

جدول شماره 4: چرخه دمایی و زمان به‌کار 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°

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 پلی‌آکریل آمید 2 درصد بارگذاری و الکتروفورز شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ژن β2M باند 106 جفت بازی(bp)، ژن *MLH1* باند 85 جفت بازی(bp) و هم‌چنین ژن CTGF باند 64 جفت بازی(bp) تک باند بر روی ژل پلی‌آکریل آمید دارد و پرایمرهای طراحی شده برای این سه ژن اختصاصی عمل می‌کنند(تصویرشماره 1).

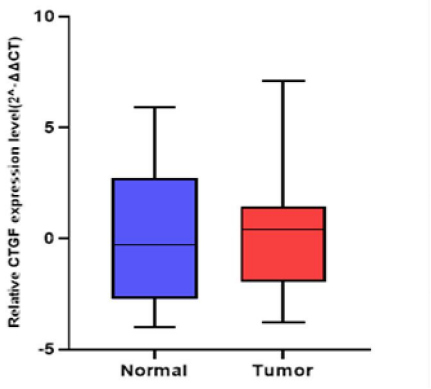


تصویر شماره 1: بررسی تکثیر اختصاصی محصولات Real_Time PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید. شماره 1 مربوط به ژن *CTGF* با طول 64 جفت باز، شماره 2 مربوط به ژن *MLH1* با طول 85 جفت باز، شماره 3 مربوط به ژن β2M با طول 106 جفت باز

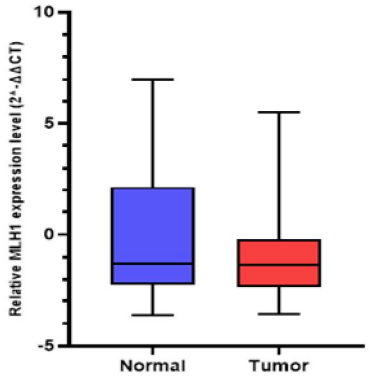
یافته‌ها و بحث

در این مطالعه میزان بیان ژن *CTGF* در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور افزایش (نمودار شماره 1) و میزان بیان ژن *MLH1* کاهش یافته است (نمودار شماره 2). هم‌چنین طبق بررسی‌های 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 *MLH1* در بافت سرطانی نسبت به بافت سالم مجاور، 0/22 برابر کاهش (P<0/05) داشته است(نمودار شماره 2).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]



نمودار شماره 1: میزان بیان ژن *CTGF* طبق فرمول 2^-ΔΔCT



نمودار شماره 2: میزان بیان ژن *MLH1* طبق فرمول 2^-ΔΔCT

ژن *CTGF* مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تکثیر تومور را فعال می‌کند. به‌عنوان مثال، گزارش شده است که *CTGF* چسبندگی کانونی کیناز/SRC/فاکتور هسته‌ای کاپا p65-B (سیگنال‌دهی FAK/SRC/NF-kB p65) را فعال می‌کند، که منجر به تنظیم مثبت سطح بیان ژن *GLUT3* می‌شود و با اتصال مستقیم به گیرنده اینتگرین، تکثیر سلول‌های تومور را تسریع می‌کند(18،19).

طبق مطالعات Guo و Zhang و Lun و Ladwa، سطح بیان ژن *CTGF* در نمونه‌های توموری افزایش پیدا می‌کند(20-23). در پژوهش حاضر نیز، بیان ژن *CTGF* در نمونه‌های توموری سرطان کلورکتال نسبت به نمونه‌های سالم مجاور آن، بیش‌تر بوده است (P<0/05).

Pinto و همکاران نیز در سال 2018، مؤثر بودن متیلاسیون *MLH1* برای تشخیص سندروم لینچ (Lynch syndrome) (سرطان کلورکتال 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 پروموتر *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 نمونه‌های سرطانی کلورکتال نسبت به نمونه‌های سالم مجاور آن دیده شده است(P<0/05). در این مطالعه، بیان ژن *CTGF* در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم مجاور آن افزایش و بیان ژن *MLH1* در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های سالم مجاور آن کاهش یافته است. با انجام آزمایش‌های مشابه با تکنیک‌های نوین و کارآمدتر و بررسی جامعه آماری گسترده‌تر می‌توان از صحت یافته‌های کنونی اطمینان حاصل نمود و ژن‌های مذکور به‌عنوان بیومارکر تشخیصی، جهت تشخیص زودهنگام سرطان کلورکتال و پیگیری روند بیماری در نظر گرفته شوند. به امید آن‌که در آینده‌ای نزدیک ، این بیومارکرها بتوانند در بهبود وضعیت تشخیص و درمان سرطان شایع کلورکتال نقش داشته باشند.

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-23]