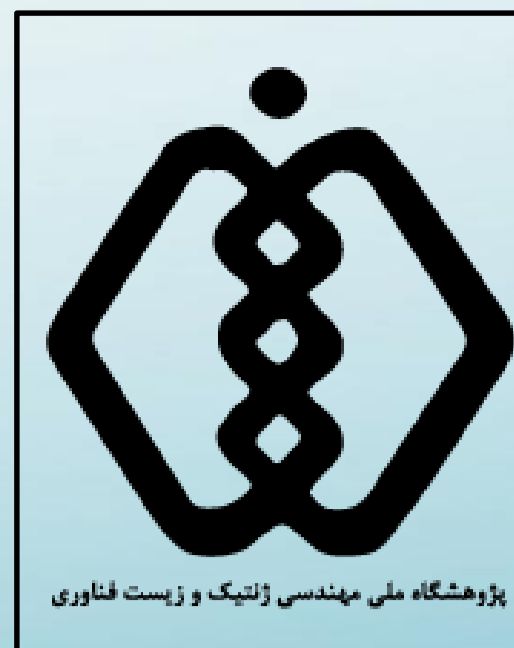




بررسی تاثیر ترکیبات گیاهان دارویی بر بیان ژن‌ها در سلول‌های سرطانی با استفاده از روش فراتحلیل



فضیله اسماعیلی^۱، تهمینه لهراسبی*^۱، منصور ابراهیمی^۲، اسماعیل ابراهیمی^۳، محسن فرهادپور^۱

^۱ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران

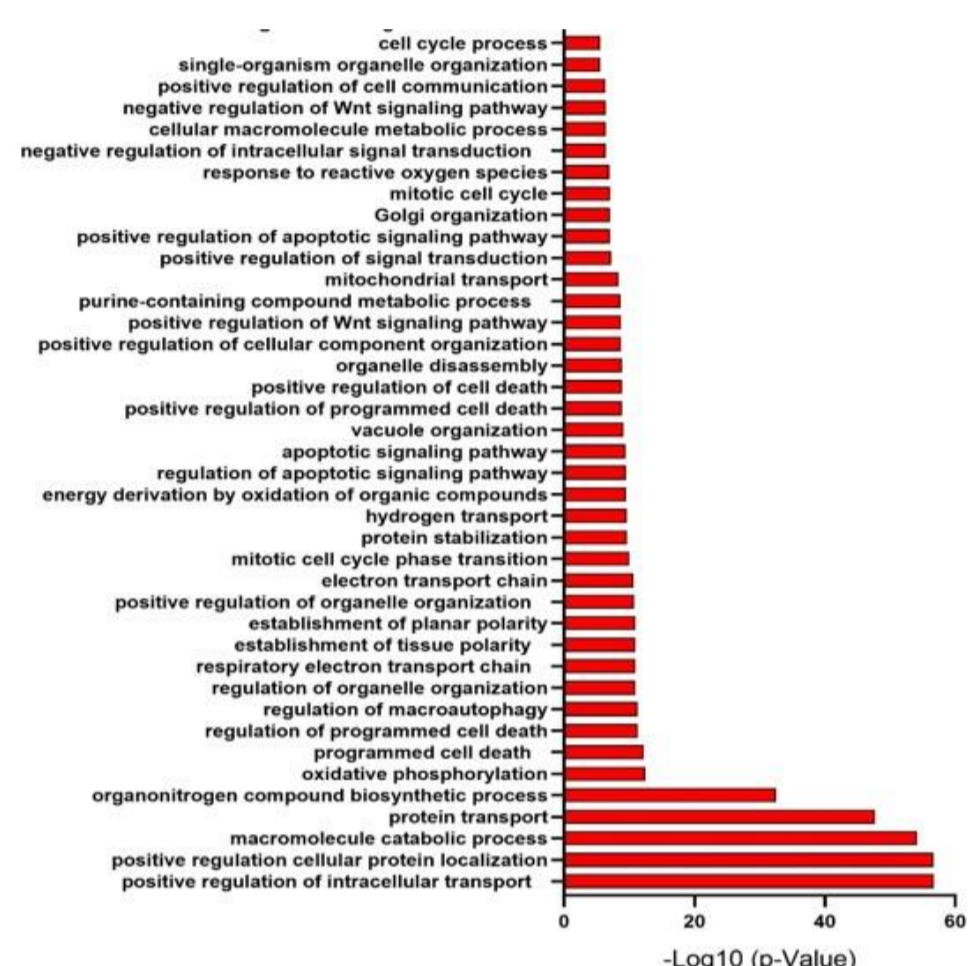
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

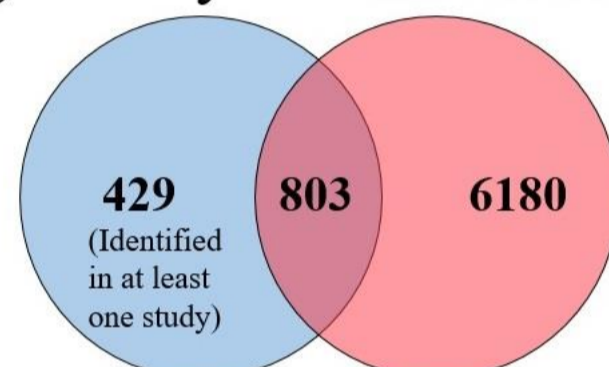
Nasibe.esmaili@gmail.com

نتایج

نتایج حاصل از فراتحلیل داده‌های مورد استفاده نشان داد که ۶۹۸۳ ژن (با احتمال بالای ۹۹ درصد) روند افزایشی معنی‌دار در بیان داشتند. تعداد ۶۱۸۰ ژن در هیچ کدام از بررسی‌های منفرد معنی‌دار نشده بودند (شکل یک) و این نتیجه تاییدی محکم بر بالاتر بودن توان آماری فراتحلیل در شناسایی ژن‌هایی است که تفاوت بیانی نشان می‌دهند. همچنین طبق نتایج فراتحلیل کاهش بیان هیچ ژنی معنی‌دار نشد. نتایج بررسی فرآیندهای زیستی و شبکه‌های کارکردی توسط بررسی هستی شناسی ژن‌های به دست آمده از فراتحلیل نشان داد متا-ژن‌های افزایش بیان یافته در شصت و چهار گروه عملکردی با $q < 0.01$ معنی‌دار شدند. اکثریت ژن‌ها در فرایندهای مکان‌یابی و انتقال پروتئین‌ها، مهار تکثیر سلول و مرگ برنامه ریزی شده سلولی نقش تنظیمی مثبت داشتند (شکل دو).



Single study Meta analysis



شکل دو. بررسی هستی شناسی متا-ژن‌ها با استفاده از پایگاه آنالیز DAVID

شکل یک. ون دیاگرام مربوط به توزیع ژن‌های افتراقی شناسایی شده در فراتحلیل

چکیده

تحقیقات نشان داده‌اند شناسایی مکانیسم عملکردی پاسخ دهنده به تیمارهای مبتنی بر ترکیبات گیاهی در سلول‌های سرطانی می‌تواند موجب بهبود تشخیص، پیشگیری و انتخاب راه‌های درمانی کارآمد در سرطان شود. در این تحقیق با هدف بالا بردن توان تجزیه آماری در شناسایی ژن‌ها و مسیرهای زیستی القا شده توسط ترکیبات گیاهی در سلول‌های سرطانی، از روش فراتحلیل استفاده شد. در این راستا تجزیه داده شش بررسی مستقل RNA-Seq که پروفایل بیانی رده‌های سلولی سرطانی هنگام تیمار با ترکیبات گیاهی را بررسی کرده بودند، توسط پکیج meta-Seq تحت آزمون فیشر انجام شد. داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که با استفاده از روش فراتحلیل مجموعه کامل‌تری از مسیرهای زیستی پاسخ دهنده به محصولات طبیعی و عصاره‌های گیاهی بدست آمد که در بررسی‌های انفرادی معنی‌دار نشده بودند. از جمله مهم‌ترین مسیرهای القا شده می‌توان به مکان‌یابی و انتقال پروتئین، آپتوز و مهار تکثیر سلولی اشاره کرد. تنظیم مثبت مکان‌یابی و انتقال پروتئین مسیر جدیدی در رابطه با اثر ترکیبات گیاهی در بیماری سرطان است که با وجود در بر گرفتن بیشترین شمار ژن در این بررسی، در بررسی‌های گذشته کمتر به آن پرداخته شده است.

کلمات کلیدی: فراتحلیل، ترکیبات گیاهی، مسیرهای زیستی، مکان‌یابی پروتئین

مقدمه

امروزه هدف اصلی داروشناسی مدرن در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان روشن کردن مکانیسم‌های ملکولی است که می‌تواند توسط ترکیبات دارویی قرار گیرد (۱). بنابراین شناسایی ژن‌های درگیر در سرطان که به نوبه خود و به طور بالقوه توسط ترکیبات گیاهی تنظیم می‌شود، می‌تواند در شناسایی راه‌های درمانی جدید نقش بسزایی داشته باشد (۲). یکی از راه‌های تشخیص ژن‌های با بیان افتراقی در سلول‌های سرطانی تیمار شده با ترکیبات طبیعی نسبت به سلول‌های سرطانی بدون تیمار (کنترل)، تجزیه و تحلیل مجموعه داده‌های بیان ژن است. در چندین مطالعه RNA-Seq به بررسی پاسخ سلول‌های سرطانی به ترکیبات گیاهی پرداخته شده است (۳) اما مقایسه مستقیم نتایج تجزیه و تحلیل این بررسی‌ها و به طور کلی مطالعات ترنسکریپتومیکس با زمینه‌های یکسان به علت متفاوت بودن طرح آزمایش و پلتفرم‌های مورد استفاده، محدودیت در تعداد تکرار نمونه‌ها و همچنین تفاوت در شرایط آزمایش ممکن نیست (۴). از طرفی حجم بالایی از اطلاعات بیان ژن در پایگاه‌های اطلاعاتی نظیر NCBI در دسترس پژوهشگران است که امکان بازیابی، یکی کردن و تجزیه دوباره این داده‌ها برای استخراج داده‌های بیشتر را فراهم کرده است (۸). فراتحلیل یک آنالیز آماری قوی است که امکان ترکیب نتایج چندین مطالعه علمی با فرضیه‌های همسان را در اختیار ما قرار می‌دهد (۶). بنابراین در پژوهش حاضر از داده‌های خام شش مطالعه RNA-Seq با هدف بررسی پاسخ ژن‌های درگیر در سرطان به ترکیبات گیاهی برای انجام فراتحلیل استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق برای گردآوری داده‌ها از پایگاه‌های اینترنتی EBI، NCBI و DDBJ استفاده شد. شش مطالعه جمع‌آوری شد که در برگیرنده اثرات دارویی برخی مواد گیاهی بر روی رده‌های سلولی سرطانی بودند. خوانش‌های مربوط به هر مطالعه با فرمت FASTQ از پایگاه‌های مذکور دانلود شدند. داده‌های به دست آمده در نوع رده‌های سلولی سرطانی، نوع و ترکیب گیاهی و مدت زمان تیمار با هم متفاوت بودند (جدول شماره یک). به منظور بررسی کیفیت و آنالیز داده‌های RNA-seq از نرم افزار CLC genomics workbench (version 12) استفاده شد. بررسی فراتحلیل با استفاده از پکیج meta-Seq و الگوریتم دقیق فیشر انجام شد. ژن‌هایی که پس از فراتحلیل به صورت معنی‌داری با احتمال $q \leq 0.01$ دارای بیان متفاوت بودند متا-ژن نام‌گذاری شدند. برای طبقه بندی و شناسایی مسیرهای زیستی مرتبط با متا-ژن‌ها از پایگاه داده آنالیز DAVID 6.8 استفاده شد تا بتوان دید جامع‌تری نسبت به ژنومیکس عملکردی آن‌ها بدست آورد.

جدول یک مشخصات مطالعات دانلود شده از سه پایگاه داده EBI، DDBJ، NCBI

Study	GEO platform ID	No. of arrays (Control: Treatment)	Cell line(s)	Compound type	treatment time	Dose of compound
1	Illumina HiSeq	6 (3:3)	PC-3	WCE	24h	10 µg/ml
2	Illumina HiSeq	20 (10:10)	HCT116, SW480, SW620, HT29, RKO	OPC	18h	100 ng/ml
2	Illumina HiSeq	20 (10:10)	HCT116, SW480, SW620, HT29, RKO	GSE	18h	100 ng/ml
3	Illumina HiSeq	9 (3:6)	MCF-7	Kushen	48 h	1 & 2 mg/ml
3	Illumina HiSeq	9 (3:6)	MCF-7	Kushen	24 h	1 & 2 mg/ml
3	Illumina HiSeq	12 (6:6)	MCF-7	Kushen	24 h & 48h	1 mg/ml
3	Illumina HiSeq	12 (6:6)	MCF-7	Kushen	24 h & 48h	2 mg/ml
4	Illumina HiSeq	12 (6:6)	LNCAP	SFN	6h & 24h	15 µM
4	Illumina HiSeq	12 (6:6)	PC-3	SFN	6h & 24h	15 µM
4	Illumina HiSeq	12 (6:6)	PC-3 & LNCAP	SFN	6h	15 µM
4	Illumina HiSeq	12 (6:6)	PC-3 & LNCAP	SFN	24h	15 µM
5	Illumina HiSeq	4 (2:2)	A549	JFK	48 h	30 g/ml
6	Illumina HiSeq	6 (3:3)	MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231	shikonin	6h	10 µM

بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

در این بررسی با انجام فراتحلیل اختصاصی روی داده‌های بیان ژن توانستیم توان تجزیه را با یکی کردن نتایج شش بررسی مرتبط بالا ببریم. به طوری که ۸۸ درصد از ژن‌هایی که در این بررسی تفاوت بیان معنی‌دار نشان دادند در هیچ کدام از بررسی‌های انفرادی معنی‌دار نشده بودند. افزایش توان تجزیه و افزایش شمار ژن‌هایی که تفاوت بیان معنی‌دار نشان دادند ضمن تایید مسیرهای زیستی که در بررسی‌های گذشته شناسایی شده بود شامل ارائه مجموعه کاملی از مسیرهای مرتبط با تنظیم مکان‌یابی و انتقال پروتئین نیز بود. مکان‌یابی و انتقال پروتئین‌ها به طور فزاینده‌ای توسط عصاره‌های گیاهی و محصولات طبیعی تنظیم می‌شود. ثابت شده است پروتئین‌ها برای اعمال عملکرد بیولوژیکی و همچنین تعامل با دیگر ملکول‌ها باید در زمان مناسب در مکان صحیح قرار بگیرند (۷). مکان‌یابی نادرست می‌تواند منجر به ایجاد تغییراتی از جمله موتاسیون در توالی ماده ژنتیکی، اختلال در تغییرات پس از ترجمه، اختلال در سطح بیان پروتئین یا دیگر پروتئین‌های تحت کنترل آن و همچنین ارتقای تومورزایی و متاستاز شود. در نتیجه کشف عواملی که منجر به بازیابی صحیح مکان‌یابی پروتئین شود می‌تواند بعنوان یک استراتژی درمانی امیدوار کننده حائز اهمیت باشد. سرطان از جمله بیماری‌هایی است که به دنبال مکان‌یابی‌های ناصحیح اما برگشت‌پذیر پروتئین‌های دخیل در مسیرهای سیگنالینگ ضروری ایجاد می‌شود. بنابراین استفاده از عواملی که منجر به بازیابی صحیح مکان‌یابی پروتئین شود می‌تواند یک تکنولوژی مفید و کارآمد برای درمان‌های ضد سرطانی مورد استفاده قرار گیرد (۷). در این راستا فراتحلیل منجر به کشف و معرفی مسیرهای جدیدی شد که در گزارش‌های انفرادی کمتر گزارش شده و یا به کلی گزارش نشده است.

منابع

- Hosseini, Azar, and Ahmad Ghorbani. 2015. 'Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies', *Avicenna journal of phytomedicine*, 5: 84.
- Singh, Sukhdev, Bhupender Sharma, Shamsheer S Kanwar, and Ashok Kumar. 2016. 'Lead phytochemicals for anticancer drug development', *Frontiers in Plant Science*, 7: 1667.
- Sharifi, Somayeh, Abbas Pakdel, and Esmaeil Ebrahimi. 2017. 'Meta-analysis of transcriptomic data of mammary gland infected by Escherichia coli Bacteria in dairy cows', *Iranian Journal of Animal Science*, 48: 343-52.
- Mohammadi-Dehcheshmeh, Manijeh, Ali Niazi, Mansour Ebrahimi, Mohammadreza Tahsili, Zahra Nurollah, Reyhaneh Ebrahimi Khaksefidi, Mahdi Ebrahimi, and Esmaeil Ebrahimi. 2018. 'Unified transcriptomic signature of Arbuscular mycorrhiza colonization in roots of Medicago truncatula by integration of machine learning, promoter analysis and direct merging meta-analysis', *Frontiers in Plant Science*, 9: 1550.
- Jung, Junghyun, Changsoo Mok, Woosuk Lee, and Wonhee Jang. 2017. 'Meta-analysis of microarray and RNA-Seq gene expression datasets for carcinogenic risk: An assessment of Bisphenol A', *Molecular & Cellular Toxicology*, 13: 239-49.
- Tsuyuzaki, Koki, and Itoshi Nikaido. 2013. 'metaSeq: Meta-analysis of RNA-seq count data', *Tokyo University of Science, Tokyo*.
- Hung, Mien-Chie, and Wolfgang Link. 2011. 'Protein localization in disease and therapy', *J Cell Sci*, 124: 3381-92.

چهارمین کنفرانس زیست شناسی سامانه‌های ایران

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

۶ و ۷ اسفندماه ۱۳۹۸