

## Evaluation of the Effects of Interferon on Stability of Control Genes in Huh-7 and HepG<sub>2</sub> Cells

Atieh Hashemi<sup>1</sup>, Farzin Roohvand<sup>2\*</sup>, Mohammad-Hossein Ghahremani<sup>3</sup>, Rosita Edalat<sup>4</sup>

1- Ph.D. Candidate, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- M.Sc., Department of Virology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran  
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

Received: 07/Apr/2012, Accepted: 24/Jul/2012

### Abstract

**Objective:** Understanding gene expression variations by using RNA transcript analysis methods during hepatic viral protein interactions with the IFN pathway in hepatic cell lines has recently gained importance. One of the most powerful techniques in gene expression quantification is quantitative real-time RT-PCR. Reference genes used as normalizer in this method may be affected across various experimental conditions or treatments. Hence, in the present study, the influence of IFN- $\alpha$  treatment on the mRNA levels of common reference genes including ACTB, GAPDH, TBP, HPRT1 and HMBS was evaluated in Huh-7 or HepG<sub>2</sub> cell lines.

**Methods:** Cells were treated with different concentrations of IFN- $\alpha$ . Then, using geNorm and NormFinder programs, we evaluated the expression stabilities of the above prominent reference genes in three sample groups that included each hepatic cell line and the total data sets.

**Results:** HPRT-1 and GAPDH were the most stable reference genes in the Huh-7 cell line, whereas ATCB, HMBS and GAPDH were the most stable in the HepG<sub>2</sub> cell line. TBP was one of the least stable reference genes in the three studied groups.

**Conclusion:** This investigation will provide appropriate reference genes for standardization of quantitative real-time PCR data in an IFN- $\alpha$  stimulated model of hepatocyte cell lines.

**Keywords:** Huh-7, HepG<sub>2</sub>, Control Genes, IFN- $\alpha$

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 73-85

# بررسی تأثیر اینترفرون بر پایداری ژن‌های کنترل در رده‌های سلولی HepG<sub>2</sub> و Huh-7

عطیه هاشمی<sup>۱</sup>، فرزین روحوند<sup>۲\*</sup>، محمدحسین قهرمانی<sup>۳</sup>، رزیتا عدالت<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، گروه هیپاتیت و ایدز  
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۵/۰۳

دریافت مقاله: ۹۱/۰۱/۱۹

## چکیده

**هدف:** اخیراً به‌کارگیری روش‌های بررسی رونوشت‌های اسیدهای ریبونوکلیک به منظور درک تغییرات بیانی ژن‌ها طی تداخلات پروتئین‌های ویروس‌های کبدی با مسیر اینترفرون در رده‌های سلولی کبدی اهمیت فراوانی یافته‌اند. یکی از قدرتمندترین روش‌ها در بررسی‌های کمی بیان ژن‌ها روش کمی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی است. بیان ژن‌های مرجعی که برای نرمالیزه کردن نتایج در این روش به‌کار گرفته می‌شوند ممکن است تحت تأثیر شرایط مختلف آزمایشی یا تیمارهای مختلف قرار بگیرد. بنابراین در این مطالعه، تأثیر تیمار با اینترفرون آلفا بر سطح اسید ریبونوکلیک پیام‌آور ژن‌های مرجع متداول شامل ACTB، GAPDH، TBP، HPRT-1 و HMBS در رده‌های سلولی HepG<sub>2</sub> و Huh-7 بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اینترفرون آلفا تیمار شدند. سپس با کمک دو نرم‌افزار geNorm و NormFinder ثبات بیان ژن‌های مرجع مورد مطالعه در سه گروه نمونه شامل هریک از رده سلولی کبدی و مجموع دو رده با هم بررسی شد.

**نتایج:** HPRT-1 و GAPDH پایدارترین ژن‌ها در رده سلولی Huh-7 هستند در حالی که HMBS، ACTB و GAPDH در رده سلولی HepG<sub>2</sub> پایدارترین ژن‌ها هستند. به علاوه TBP یکی از ناپایدارترین ژن‌های مرجع در گروه‌های مورد مطالعه بوده است.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش ژن‌های مرجع مناسب برای استاندارد کردن نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی در مدل سلول کبدی تحریک شده با اینترفرون آلفا را معرفی می‌کند.

**کلیدواژگان:** Huh-7، HepG<sub>2</sub>، ژن‌های کنترل، اینترفرون آلفا

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۷۴-۸۵

## مقدمه

(Cirrhosis) و کارسینومای کبدی (Liver Carcinoma)

شود. از آنجایی که درصد بالایی از بیماران به درمان با اینترفرون آلفا (Interferon alpha: IFN- $\alpha$ ) پاسخ مناسبی نمی‌دهند [۱-۳].

عفونت‌های ویروسی هیپاتیت C و B می‌تواند منجر به

بیماری‌های مزمن کبدی نظیر هیپاتیت مزمن، سیروز

## بررسی پایداری ژن‌های کنترل در رده‌های سلولی کبدی

منجر به حصول نتایجی کاملاً متفاوت با شرایطی می‌شود که در آن ژن مرجع با ثبات به‌کار گرفته نشده است [۱۳]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ با هدف یافتن مناسب‌ترین ژن مرجع برای بررسی بیان ژن‌ها توسط این روش در رده‌های سلولی سرطان کبد انجام شد، GAPDH و هیدروکسی متیل-بیلان سینتاز (Hydroxymethylbilane Synthase: HMBS) به عنوان پایداری‌ترین ژن‌های مرجع از میان شش ژن دیگر معرفی شدند [۱۴]. مطالعاتی دیگری از این دست نشان داد که هیپوزانتین فسفوریبوزیل-ترانسفراز (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1: HPRT-1) و پروتئین متصل شونده به جعبه TATA (TATA-Binding Protein: TBP) با ثبات‌ترین ژن‌های مرجع برای بررسی بیان ژن‌ها در بافت سرطانی کبد که به ویروس هپاتیت B و یا C آلوده شده‌اند، است [۱۵-۱۷]. از آنجایی که ایتترفرون‌ها از طریق اثر بر گروه بزرگی از ژن‌ها آثار زیستی متعددی نشان می‌دهند [۱۸]، بیان ژن‌های مرجع نیز ممکن است تحت تأثیر ایتترفرون قرار بگیرد. بنابراین در مطالعات بررسی تغییرات بیانی که روی سلول‌های کبدی در حضور ایتترفرون انجام می‌شود، اولین گام برای دستیابی به نتایج معنی‌دار انتخاب با ثبات‌ترین ژن مرجع است. در این مطالعه تلاش شده است که در رده‌های سلولی کبدی (Huh-7, HepG<sub>2</sub>) که با ایتترفرون تحریک شده‌اند با به‌کارگیری دو نرم‌افزار geNorm [۱۹، ۲۰] و NormFinder [۲۱] با ثبات‌ترین ژن‌ها از میان پنج ژن ACTB (بتا-اکتین)، GAPDH، HMBS، TBP و HPRT-1 معرفی شوند.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلولی و مجاورت با ایتترفرون

رده‌های سلولی سرطان کبد انسان شامل Huh-7 (Invitrogen، آمریکا) و HepG<sub>2</sub> (NCBI، ایران) در این مطالعه به‌کار گرفته شد. این سلول‌ها در محیط *Dulbecco's Modified Eagle* (Biosera، انگلستان) حاوی

مطالعات گسترده‌ای در راستای دستیابی به مکانیسم‌های مقاومت به ایتترفرون در شرایط برون‌تنی (In Vitro) در سلول‌های سرطانی کبدی شکل گرفته است [۴، ۵]. بررسی اثر ایتترفرون بر بیان ژن‌های پایین‌دستی در سلول‌های کبدی آلوده به ویروس یا اجزای ویروسی یکی از راه‌های دستیابی به این مکانیسم‌های مقاومت است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Quantitative Real Time PCR: qRT-PCR) یکی از بهترین روش‌ها در تجزیه و تحلیل کمی تغییرات بیانی ژن‌ها محسوب می‌شود. این روش اختصاصی، حساس و قابل اعتماد است و به طور گسترده در مطالعات بیان ژن‌ها به کار می‌رود [۶]. در این روش عواملی نظیر میزان متفاوت ماده اولیه، کارآمدی متفاوت استخراج اسید ریبونوکلیک همچنین حضور مهارکننده‌ها می‌تواند منجر به حصول نتایج غیر دقیق شود [۷]. متداول‌ترین روش برای غلبه بر این نوسانات و نرمالیزه کردن (Normalization) نتایج، به‌کارگیری ژن‌های مرجع است. ژن مرجعی مطلوب است که در شرایط مختلف آزمایش بیان ثابتی داشته باشد [۸]. مطالعات اخیر نشان دهنده نوسانات بیانی ژن‌های مرجع متداول در مراحل مختلف سلولی نظیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) [۹]، درمان‌های مختلف دارویی نظیر هورمون‌ها [۱۰]، شرایط مختلف محیطی مانند هیپوکسی (Hypoxia) [۱۱] یا در بافت‌ها و انواع مختلف رده‌های سلولی [۱۲] است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای نشان داده شده است که بیان گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase: GAPDH) یکی از متداول‌ترین ژن‌های مرجع - تحت تأثیر استرادیول (Estradiol) در سلول‌های MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) افزایش می‌یابد [۱۰]. از آنجایی که ژن مرجع واحد با ثبات برای تمام آزمایش‌های RT-PCR موجود نیست بنابراین باید در هر مطالعه‌ای به طور خاص با ثبات‌ترین ژن مرجع را به‌کار برد. در همین راستا در مطالعه‌ای نشان داده شد که انتخاب صحیح و دقیق ژن مرجع برای نرمالیزه کردن نتایج RT-PCR تأثیر قابل ملاحظه‌ای در نتایج خواهد داشت و

۱۲۵ واحد بر میلی لیتر در مدت زمان‌های ۲۴ و ۱۲ ساعت و ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ واحد بر میلی لیتر در مدت زمان ۶ ساعت تیمار شدند (جدول ۱). نمونه کنترل در هر رده سلولی همان سلول‌های طبیعی بود که ۲۴ ساعت پس از زمان کشت و رشد در شرایط بهینه ذکر شده به منظور استخراج تمامی اسیدهای ریبونوکلئیک سلولی جمع‌آوری شدند. هریک از نمونه‌ها برای هر دو رده سلولی تهیه شد.

۱۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده توسط حرارت (Invitrogen, Gibco, آمریکا) و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین (Streptomycin) (۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر) و پنی سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) (Biosera, انگلستان) و تحت ۱۰ درصد CO<sub>2</sub> در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اینترفرون آلفا (Peprotech, آمریکا) شامل ۵۰۰، ۲۵۰ و

جدول ۱ مدت زمان مجاورت سلول‌ها با اینترفرون آلفا و غلظت به کار رفته در گروه‌های مختلف

شماره نمونه	غلظت* اینترفرون آلفا (ساعت)	زمان مجاورت با اینترفرون آلفا (ساعت)
۱	۵۰۰	۲۴
۲	۲۵۰	۲۴
۳	۱۲۵	۲۴
۴	۵۰۰	۱۲
۵	۲۵۰	۱۲
۶	۱۲۵	۱۲
۷	۱۰۰۰	۶
۸	۵۰۰	۶
۹	۲۵۰	۶
کنترل	-	-

\* غلظت‌های مختلف اینترفرون آلفا به محیط کشت سلول‌های Huh-7 و HepG<sub>2</sub> یک روز پس از کاشتن افزوده شد. هر یک از نمونه‌ها برای هر دو رده سلولی تهیه شد.

جدول ۲ مشخصات ژن‌های مرجع انتخاب شده

نشانه ژن	نام ژن	عملکرد ژن	شناسه ژن در بانک ژن
GAPDH	گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز	آنزیم گلیکولیتیک	NM_002046
ACTB	بتا-اکتین	پروتئین ساختاری اسکلت سلولی	NM_001101
HPRT-1	هیپوزانتین فسفوریبوزیل-ترانسفراز	سنتز پورین در مسیر بزاق	NM_000194
TBP	TATA box بایندینگ پروتئین	فاکتور رونویسی اسید ریبونوکلئیک ترانسفراز II	NM_003194
HMBS	هیدروکسی متیل-بیلان سینتاز	سنتز هم، متابولیسم پورفیرین	NM_000190.3

Mini Kit (Qiagen, آلمان) طبق برنامه مربوط استخراج شد. سپس ۲ میکروگرم از اسید ریبونوکلئیک تام سلولی در مجاورت با ۰/۲ میکروگرم آغازگر (Random Hexamer Primers) به

استخراج اسید ریبونوکلئیک تام سلولی (RNA) و تبدیل به اسید دزوکسی ریبونوکلئیک مکمل (cDNA) اسید ریبونوکلئیک تام سلولی به کمک RNeasy plus

## بررسی پایداری ژن‌های کنترل در رده‌های سلولی کبدی

می‌کند. آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر رونوشت‌های ژن ACTB عبارتست از 5'-CCCTGCACATGCCGGAG-3' و 5'-GCACAGAGCCTCGCCTT-3' که محصول تکثیر شده ۱۱۳ جفت‌باز طول دارد. رونوشت‌های ژن HPRT-1 با آغازگرهای اختصاصی 5'-ACCCTTTCCAAATCCTCAGC-3' و 5'-TCCTCCTCCTGAGCAGTCA-3' تکثیر و محصولی به طول ۱۴۷ جفت‌باز تولید شد؛ در حالی که رونوشت‌های ژن TBP با آغازگرهای 5'-TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC-3' و 5'-TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA-3' به طور اختصاصی تکثیر شد و محصول تکثیر شده ۲۲۷ جفت‌باز طول داشت. همچنین آغازگرهای اختصاصی 5'-GTACCCACG و 5'-AGCCTACTTTCCAAG و 5'-CGGAG-3' در تکثیر رونوشت‌های ژن HMBS به کار رفت که حاصل این تکثیر قطعه‌ای به طول ۹۶ جفت‌باز بود (جدول ۲). آغازگرها با بالاترین کیفیت سنتز شدند (Eurofins MWG Operon، آلمان). اختصاصیت آغازگرها با کمک تجزیه و تحلیل منحنی ذوب و بررسی باندهای اختصاصی در محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی با کمک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تأیید شد.

## واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی با استفاده

### از سایبرگرین (SYBR Green)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با کمک دستگاه Rotor-Gene 6000 و کیت SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time, TaKaRa Biotechnology، ژاپن) طبق چرخه دمایی اولیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و در ادامه (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۶ ثانیه) به تعداد ۳۵ چرخه انجام شد. هر تیوب حاوی ۱۰ میکرولیتر مواد مورد نیاز برای واکنش شامل ۰/۵ میکرولیتر از اسید دزوکسی ریبونوکلیک مکمل - حاصل تبدیل ۵۰ نانوگرم اسید ریبونوکلیک - ۰/۵ میکرولیتر

مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه (Incubate) و سریعاً روی یخ سرد شد.

سپس به این مخلوط بافر (۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl، ۵۰ میلی‌مولار KCl، ۴ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>، ۱۰ میلی‌مولار DTT (Dithiothreitol)، pH ۸/۳)، مهارکننده تخریب اسید ریبونوکلیک (Ribolock) (۲۰ واحد)، مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs mix) (۵۰ میلی‌مولار) و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase) (۲۰۰ واحد) افزوده شد و به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس به اسید دزوکسی ریبونوکلیک مکمل تبدیل شد. واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. در نهایت ترانسکریپتاز در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال شد. (تمام ترکیبات به کار گرفته شده در این مرحله از شرکت Fermentas فرانسه تهیه شد).

## طراحی آغازگر

در این مطالعه پنج ژن مرجع شامل ACTB و GAPDH که از متداول‌ترین ژن‌های مرجع در نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها هستند و HMBS، TBP و HPRT-1 که در مطالعات اخیر روی سلول‌های سرطانی کبدی جدا شده از بیمار به عنوان ژن‌های مرجع با بیان ثابت معرفی شده‌اند به کار گرفته شد [۱۴] (جدول ۲). توالی ژنومی ژن‌های انتخاب شده از پایگاه اطلاعاتی بانک ژن (Gene Bank Database) به دست آمد و آغازگرها با کمک نرم‌افزار "Primer 3 Software" طراحی شد (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/>) (primer3-www.cgi). آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر رونوشت‌های ژن GAPDH عبارت است از 5'-TTAAAA و 5'-CTCTGCTCCTCC و GCAGCCCTGGTGAC-3' و 5'-TGTTTCGAC-3' که محصولی به اندازه ۱۴۴ جفت‌باز تولید

## بررسی کارآمدی RT-PCR

کارآمدی PCR برای هر جفت آغازگر بر طبق شیب منحنی استاندارد رسم شده به دست آمد. منحنی استاندارد براساس چهار برابر رقیق‌سازی از نمونه کنترل رسم شد که این رقیق‌سازی چهار بار تکرار شد و منحنی با کمک این چهار نقطه رسم شد. در صورت در نظر گرفتن عدد ۲ برای ۱۰۰ درصد کارآمدی، کارآمدی PCR برای جفت آغازگرها بین ۱/۹۳-۲/۱۵ متغیر بود و ضریب همبستگی ( $R^2$ ) بین ۰/۹۹۰-۰/۹۹۸ متغیر بود (جدول ۳).

جدول ۳ کارآمدی PCR و ضریب همبستگی برای هر جفت آغازگر

نشانه ژن	ضریب همبستگی ( $R^2$ )		کارآمدی (E)	
	Huh-7	HepG <sub>2</sub>	Huh-7	HepG <sub>2</sub>
GAPDH	۰/۹۹۳	۰/۹۹۹	۱۱۵ درصد	۹۳ درصد
ACTB	۰/۹۹۲	۰/۹۹۵	۱۰۸ درصد	۹۸ درصد
HPRT-1	۰/۹۹۲	۰/۹۹۸	۱۰۱ درصد	۱۰۱ درصد
TBP	۰/۹۹۲	۰/۹۹۴	۹۸ درصد	۹۹ درصد
HMBS	۰/۹۹۰	۰/۹۹۴	۱۰۵ درصد	۱۱۱ درصد

کارآمدی PCR برای هر جفت آغازگر بر طبق شیب منحنی استاندارد رسم شده در رده‌های سلولی Huh-7 و HepG<sub>2</sub> به دست آمد.

برای نمونه‌های اسید ریبونوکلیک ۲/۰۱±۰/۰۴۵ بود که نشان دهنده خلوص مناسب نمونه‌ها است. مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S اسید ریبونوکلیک ریپوزومی هنگام الکتروفورز روی ژل آگارز نشان داد که نسبت (۲۸S/۱۸S) بزرگ‌تر از ۱/۵ است که بر یکپارچگی (Integrity) مناسب اسید ریبونوکلیک دلالت می‌کند. مشاهده یک نقطه اوج (Peak) و عدم حضور آغازگر دایمر در منحنی ذوب محصولات RT-PCR و مشاهده تک باند با اندازه مورد نظر روی ژل آگارز نشان دهنده اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده است.

## نمودار بیانی ژنهای مرجع

حد آستانه (Cycle threshold: Ct) برای هر یک از ژنهای مرجع زمانی که در گروه‌های مورد مطالعه در شرایط مختلف (مجاورت با دوزهای متفاوت اینترفرون در زمان‌های انکوباسیون مختلف) قرار داده شده بودند در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میانگین مقدار

از هر آغازگر (۵ پیکومول بر میکرولیتر)، ۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی (Master Mix) حاوی سایبرگرین و ۳/۵ میکرولیتر آب استریل بود. در نهایت به منظور تأیید اختصاصیت محصول تکثیر شده و عدم تشکیل آغازگر دایمر برای هر جفت آغازگر منحنی ذوب در فاصله دمایی ۹۹-۵۰ درجه سانتی‌گراد رسم شد. هر واکنش برای هر یک از ژن‌ها چهار بار انجام شد و برای تجزیه و تحلیل‌ها از میانگین آن‌ها استفاده شد.

## تجزیه و تحلیل ثبات بیان ژن‌ها با استفاده از

### NormFinder و geNorm نرم‌افزارهای

ثبات بیان ژن‌ها با استفاده از دو نرم‌افزار geNorm (نسخه ۳/۵) و NormFinder بررسی شد. نرم‌افزار geNorm درجه ثبات ژن (M) را برای هر ژن مرجع براساس میزان نوسانات آن ژن در مقایسه دوتایی با دیگر ژن‌های موجود در آزمایش محاسبه می‌کند [۲۰]. الگوریتم نرم‌افزار NormFinder بررسی نوسانات بیان هر ژن مرجع مورد مطالعه در مقایسه با تمام ژن‌های موجود در مطالعه است [۲۱]. تمام تجزیه و تحلیل‌ها به طور مجزا برای سه گروه نمونه شامل رده سلولی Huh-7، رده سلولی HepG<sub>2</sub> و مجموع دو رده سلولی انجام شد.

## نتایج

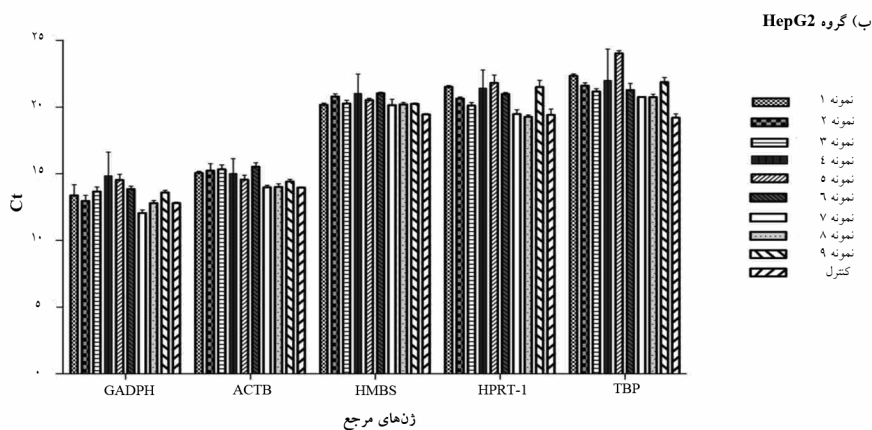
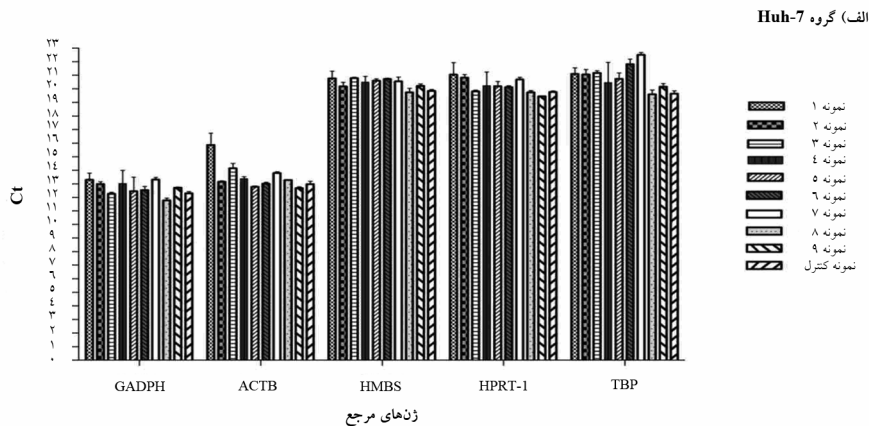
### بررسی کیفیت اسید ریبونوکلیک و اختصاصیت آغازگرها

میانگین نسبت جذب در دو طول موج (۲۶۰/۲۸۰ نانومتر)

### بررسی پایداری ژن‌های کنترل در رده‌های سلولی کبدی

در گروه Huh-7 و  $13/45 \pm 0/84$  در گروه HepG<sub>2</sub> بود که بالاترین بیان را در تمام نمونه‌های مورد مطالعه داشت (نمودار ۱).

TBP Ct معادل  $20/83 \pm 0/92$  در گروه Huh-7 و  $21/5 \pm 1/25$  در گروه HepG<sub>2</sub> بود که پایین‌ترین بیان را در تمام نمونه‌های مورد مطالعه داشت. میانگین مقدار GAPDH Ct  $12/68 \pm 0/49$



نمودار ۱ میزان Ct پنج ژن مرجع مورد مطالعه در شرایط آزمایشی متفاوت؛ میزان بیان به صورت Ct در گروه‌های الف (Huh-7) و ب (HepG<sub>2</sub>) نشان داده شده است. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اینترفرون آلفا (۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰) واحد بر میلی‌لیتر) در مدت زمان‌های (۱۲ و ۲۴ ساعت) و (۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) واحد بر میلی‌لیتر) در مدت زمان ۶ ساعت تیمار شدند.

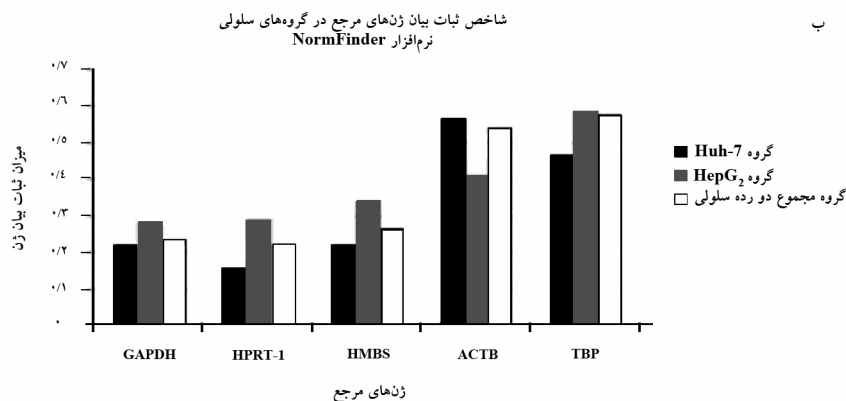
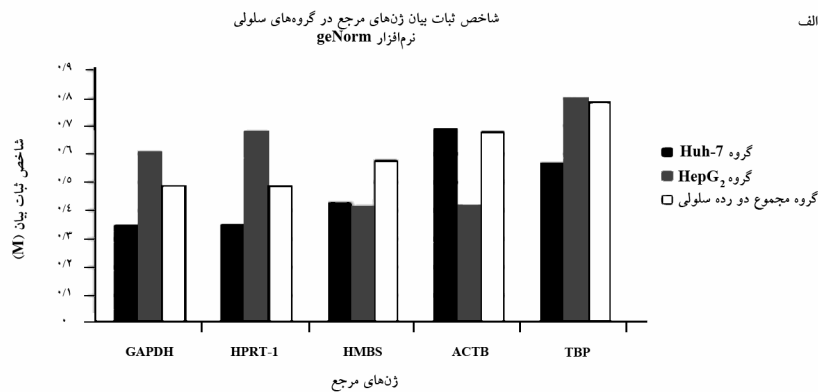
### ثبات بیانی ژن‌های مرجع

در نرم‌افزار geNorm ترتیب ثبات بیانی ژن‌های مرجع براساس میزان M Value (میزان میانگین ثبات ژن) مشخص می‌شود. هرچه میزان M Value پایین‌تر باشد بیان ژن مربوط در مطالعه مورد نظر از پایداری بالاتری برخوردار خواهد بود. نتایج نشان می‌دهد که برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها زمانی که

هر دو رده سلولی مدنظر هستند استفاده همزمان GAPDH و HPRT-1 بهترین نتیجه را خواهد داشت. همین نتیجه زمانی که گروه مورد مطالعه تنها Huh-7 هم باشد از این نرم‌افزار به دست آمد (نمودار ۲). تجزیه و تحلیل ثبات بیان ژن در گروه HepG<sub>2</sub> نشان داد که ACTB و HMBS با ثبات‌ترین ژن‌ها هستند (نمودار ۲). در نرم‌افزار NormFinder نیز مشابه با

با هر دو نرم افزار در گروه HepG<sub>2</sub>، TBP بی ثبات ترین ژن محسوب می شود، ولی برخلاف geNorm، GAPDH به عنوان با ثبات ترین ژن توسط NormFinder در این گروه معرفی شد (نمودار ۲).

geNorm عدد کمتر برای یک ژن بیانگر ثبات بیانی بالاتر است. نتایج به دست آمده از نرم افزار NormFinder در گروه Huh-7 و گروه در برگیرنده هر دو رده سلولی مشابه نتایج حاصل از نرم افزار geNorm بود (نمودار ۲) هر چند که مطابق



نمودار ۲ انتخاب مناسب ترین ژن مرجع برای نرمالیزه کردن نتایج واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی با استفاده از دو نرم افزار geNorm و NormFinder در سه گروه مورد مطالعه شامل رده سلولی Huh-7، رده سلولی HepG<sub>2</sub> و مجموع دو رده سلولی؛ الف) میزان میانگین ثبات ژن (M) برای هر ژن مرجع براساس میزان نوسانات آن ژن در مقایسه دوتایی با دیگر ژن های موجود در آزمایش توسط نرم افزار geNorm نشان داده شده است. کمترین مقدار در میزان میانگین ثبات ژن معرف با ثبات ترین ژن است. ب) نوسانات بیان هر ژن مرجع مورد مطالعه در مقایسه با تمام ژن های موجود در مطالعه توسط نرم افزار NormFinder نشان داده شده است. عدد کمتر نشان دهنده ثبات بیانی بیشتر ژن مربوط است.

نوسان بالا در نتیجه نرمالیزه کردن در صورت افزودن ژن بعدی نشان می دهد که افزودن این ژن تأثیر به سزایی در به دست آوردن نتیجه قابل اعتماد دارد [۲۰]. برطبق مطالعات پیشین عدد ۰/۲ به عنوان سطح آستانه در نظر گرفته شده است [۱۲] که

### تعداد مناسب ژن های مرجع در نرمالیزه کردن بیان ژن ها

نرم افزار geNorm همچنین قابلیت این را دارد که تعداد مناسب ژن های مرجع برای نرمالیزه کردن بیان ژن ها و دستیابی به نتایج قابل اعتماد در مطالعه مورد نظر را پیش بینی کند.

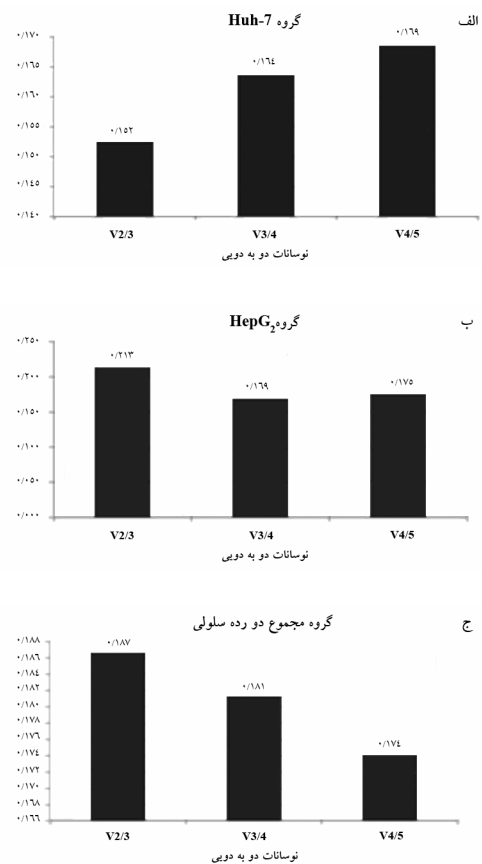


## بررسی پایداری ژن‌های کنترل در رده‌های سلولی کبدی

پایین‌تر از آن به معنی عدم نیاز در افزودن ژن بعدی برای نرمالیزه کردن است. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود استفاده از دو ژن مرجع در گروه Huh-7 و همچنین زمانی که هر دو رده سلولی مورد مطالعه هستند و به‌کار گرفتن سه ژن مرجع در گروه HepG<sub>2</sub> برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد در مطالعات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی مناسب است.

مرجع به‌کارگرفته شده برای نرمالیزه کردن نتایج امری ضروری است [۷]. مطالعات پیشین ثبات بیانی تعدادی از ژن‌های مرجع را در مطالعاتی که روی رده‌های سلولی کبدی انجام گرفته بود بررسی کرده‌اند [۱۴، ۱۵، ۱۷]. مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن تأثیر IFN- $\alpha$  را بر بیان ژن‌های مرجع در رده‌های سلولی کبدی بررسی می‌شود. غلظت‌های IFN- $\alpha$  که در این مطالعه استفاده شده است با مطالعات گذشته که در آن‌ها تأثیر IFN- $\alpha$  بر بیان ژن‌های مسیر پیام‌رسانی ایتترفرون بررسی شده منطبق است [۲۲-۲۴]. در پژوهش حاضر ثبات بیان پنج ژن مرجع (ACTB, GAPDH, HMBS, HPRT-1, TBP) با کمک دو نرم‌افزار geNorm و NormFinder بررسی شد. برخلاف نتایج به‌دست آمده در گروه Huh-7 و زمانی که هر دو رده سلولی مورد مطالعه هستند، در گروه HepG<sub>2</sub> نتایج به‌دست آمده توسط دو نرم‌افزار با یکدیگر یکسان نبود. این اختلاف در نتیجه که در مطالعات پیشین نیز به چشم می‌خورد [۱۱، ۱۲] ناشی از اختلاف در مدل‌های ریاضی به‌کار گرفته شده توسط دو نرم‌افزار است. همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود HPRT-1، HMBS و Huh-7 در گروه HMBS و ACTB در گروه HepG<sub>2</sub> بالاترین ثبات را نشان می‌دهد. در مطالعات گذشته TBP به عنوان یکی از با ثبات‌ترین ژن‌های مرجع در بافت سلولی سرطان کبد مبتلایان به هپاتیت B یا C و همچنین در رده‌های سلولی کبدی معرفی شده بود [۱۴، ۱۵، ۱۷]. جالب است که بر طبق نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر برخلاف مطالعات پیشین TBP یکی از ناپایدارترین ژن‌ها از نظر بیانی در شرایط مورد مطالعه در هر سه گروه است. ثبات بیانی HPRT-1 در مطالعات روی تغییرات بیانی ژن‌ها در سرطان‌هایی نظیر کارسینومای کلیه (Kidney Carcinoma) [۲۵] همچنین در مطالعه روی بافت‌های سرطانی کبد مبتلایان به هپاتیت‌های B و C [۱۵] به اثبات رسیده است. علاوه بر آن؛ HPRT-1 به عنوان ژن مرجع با بیان ثابت در نورون‌های هیپوکامپ (Hippocampus) که تحت تأثیر فاکتور نوروتروفیک مغزی (Brain-Derived Neurotrophic Factor: BDNF) قرار گرفته بودند [۲۶] و همچنین در کندروسیت‌هایی (Chondrocytes) که

نمودار ۳ تعداد مناسب ژن‌های مرجع برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها و دستیابی به نتایج معنی‌دار در الف) رده سلولی Huh-7، ب) رده سلولی HepG<sub>2</sub> و ج) مجموع دو رده سلولی



نمودار ۳ تعداد مناسب ژن‌های مرجع برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها و دستیابی به نتایج معنی‌دار در الف) رده سلولی Huh-7، ب) رده سلولی HepG<sub>2</sub> و ج) مجموع دو رده سلولی نشان داده شده است. عدد ۰/۲ به عنوان سطح آستانه در نظر گرفته شده است.

## بحث

به منظور به‌دست آوردن نتایج معنی‌دار و قابل قبول در RT-PCR در شرایط آزمایشی مختلف بررسی ثبات بیان ژن‌های

فعال را ندارد. علاوه بر آن؛ اغلب فاقد توالی‌های ایترونی که در اغلب ژن‌ها وجود دارد، است. این توالی‌های ژنومی بدون ایترون با کارآمدی بالا شبیه اسید دزوکسی ریبونوکلیتیک مکمل در حضور آغازگرها تکثیر می‌شود. به همین دلیل آلودگی اسید دزوکسی ریبونوکلیتیک مکمل با اسید دزوکسی ریبونوکلیتیک ژنومی منجر به حصول نتایج غیر واقعی در RT-PCR می‌شود [۳۱]. در این مطالعه از کیت RNeasy Plus Mini استفاده شده است. در این کیت ستون حذف کننده اسید دزوکسی ریبونوکلیتیک ژنومیک (gDNA Eliminator Spin Column) تعبیه شده است و بنابر ادعای شرکت تولید کننده، خلوص اسید ریبونوکلیتیک به دست آمده برای کاربردهایی نظیر RT-PCR یا میکروآرایه‌ها (Microarrays) که به مقادیر ناچیز اسید دزوکسی ریبونوکلیتیک ژنومیک حساس هستند مناسب است.

به طور خلاصه می‌توان گفت که در مطالعه حاضر به کارگیری دو نرم‌افزار geNorm و NormFinder نشان داد که به کارگیری دو ژن مرجع GAPDH و HPRT-1 در رده سلولی Huh-7 و سه ژن مرجع ACTB، HMBS و GAPDH در رده سلولی HepG<sub>2</sub> برای نرمالیزه کردن نتایج در روش RT-PCR منجر به حصول نتایج معنی دار می‌شود. لازم به ذکر است که این مطالعه اولین گزارش در بررسی ثبات بیان ژن‌های مرجع در رده‌های سلولی کبدی که در مجاورت با IFN- $\alpha$  قرار گرفته‌اند است. نتایج این مطالعه محققین را در انتخاب صحیح باثبات‌ترین ژن مرجع برای نرمالیزه کردن نتایج RT-PCR در مطالعاتی که به منظور بررسی تغییرات بیانی ژن‌ها در رده‌های سلولی کبدی که در مجاورت IFN- $\alpha$  قرار گرفته‌اند یاری می‌دهد؛ بدیهی است که این مطالعات مسیر را برای دستیابی به مکانیسم‌های مولکولی تداخلات پروتئین‌های ویروسی و اجزای مسیر پیام‌رسانی ایتترفرون هموار می‌سازد.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از نتایج پروژه (طرح) ACIP-AP20-2010 مصوب انستیتو پاستور ایران است.

تحت تأثیر ترکیباتی نظیر کورکومین (Curcumin) یا دایسرین (Dycerin) قرار گرفته بودند [۲۷] معرفی شده است. مطالعه حاضر نیز نشان داد که HPRT-1 یکی از پایدارترین ژن‌ها در مجاورت با ایتترفرون در سلول‌های Huh-7 است. یکی دیگر از متداول‌ترین ژن‌های مرجع GAPDH است که به طور گسترده در بررسی تغییرات بیانی ژن‌ها به کار می‌رود و ثبات بیانش در بافت‌های سالم و توموری مانند آستروماس (Astromas) [۲۸] و رده‌های سلولی سرطان معده [۲۹] به اثبات رسیده است. علاوه بر آن مطالعات نشان دادند که این ژن مرجع در کندروسیت‌هایی که تحت تأثیر گلوکز آمین یا ایتروکین یک بتا (Interleukin-1 beta: IL-1 $\beta$ ) قرار می‌گیرند [۲۷، ۳۰] و همچنین در رده‌های سلولی سرطانی کبد نظیر HepG<sub>2</sub> و Huh-7 [۱۴] از ثبات بیانی بالایی برخوردار است. هرچند دسته‌ای از مطالعات اخیر در شرایط آزمایشی مختلف نشان دهنده آنست که این ژن مرجع از ثبات بیانی کافی در شرایط مورد مطالعه برخوردار نبوده است [۲۸] ولی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان این ژن مرجع تحت تأثیر IFN- $\alpha$  در رده‌های سلولی HepG<sub>2</sub> و Huh-7 تغییر نمی‌کند. برخلاف TBP که یکی از پایدارترین ژن‌ها از نظر بیانی در شرایط مورد مطالعه در هر سه گروه است. از آنجایی که ایتترفرون‌ها از طریق اثر بر گروه بزرگی از ژن‌ها شامل ژن‌های تحریک شونده توسط ایتترفرون نظیر JSG20، JSG56، MxA و غیره آثار زیستی متعددی برجای می‌گذارند [۱۸]، دلیل اصلی اختلاف مشاهده شده در ثبات بیان این ژن در رده‌های سلولی کبدی می‌تواند به تأثیر IFN- $\alpha$  وابسته باشد. این مشاهده اهمیت انتخاب با ثبات‌ترین ژن‌ها را برای نرمالیزه کردن نتایج واکنش پلیمرز در زمان واقعی در شرایط آزمایشی مختلف نشان می‌دهد (حتی در مواردی که از یک رده سلولی در شرایط مختلف استفاده می‌شود).

هرچند به کارگرفتن RT-PCR به منظور بررسی تغییرات بیانی ژن‌ها، تکرارپذیر و قابل اعتماد است اما این روش محدودیت‌هایی نیز دارد. یکی از این محدودیت‌ها حضور سودوزن‌ها (Pseudogenes) است. سودوزن‌ها توالی‌های ژنومیکی است که بسیار شبیه به رونوشت‌های ژن‌ها است اما توانایی تولید پروتئین

- [1] Schinazi RF, Bassit L, Gavegnano C. HCV drug discovery aimed at viral eradication. *J Viral Hepat* 2010; 17(2): 77-90.
- [2] Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 2009; 51(6): 1046-54.
- [3] Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Mynck S, Vidaud M, Saadoun D, Soumelis V, Marcellin P. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int* 2010; 30(9): 1259-69.
- [4] Christen V, Duong F, Bernsmeier C, Sun D, Nassal M, Heim MH. Inhibition of alpha interferon signaling by hepatitis B virus. *J virol* 2007; 81(1): 159-65.
- [5] Xu J, Liu S, Xu Y, Tien P, Gao G. Identification of the nonstructural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha. *Virus Res* 2009; 141(1): 55-62.
- [6] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; 6(4): 279-84.
- [7] Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 2009; 60(2): 487-93.
- [8] Peters IR, Peeters D, Helps CR, Day MJ. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 117(1-2): 55-66.
- [9] Ferreira E, Cronjé MJ. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR in apoptosis-induced MCF-7 breast cancer cells. *Mol Biotechnol* 2011; 50(2): 121-8.
- [10] Révillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat JP. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36(8): 1038-42.
- [11] Brugè F, Venditti E, Tiano L, Littarru GP, Damiani E. Reference gene validation for qPCR on normoxia- and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: is  $\beta$ -actin a reliable normalizer for photoaging studies? *J Biotechnol* 2011; 156(3): 153-62.
- [12] Feng X, Xiong Y, Qian H, Lei M, Xu D, Ren Z. Selection of reference genes for gene expression studies in porcine skeletal muscle using SYBR green qPCR. *J Biotechnol* 2010; 150(3): 288-93.
- [13] Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005; 344(1): 141-3.
- [14] Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S. Validation

- of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* 2008; 8: 350.
- [15] Fu LY, Jia HL, Dong QZ, Wu JC, Zhao Y, Zhou HJ, Ren N, Ye QH, Qin LX. Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses. *BMC Cancer* 2009; 9: 49.
- [16] Waxman S, Wurmbach E. De-regulation of common housekeeping genes in hepatocellular carcinoma. *BMC Genomics* 2007; 8: 243.
- [17] Gao Q, Wang XY, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Shi YH, Xiao YS, Xu Y, Huang XW, Sun J. Selection of reference genes for real-time PCR in human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134(9): 979-86.
- [18] Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8(3): 237-49.
- [19] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): 0034.1-0034.11.
- [20] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. GeNorm software manual, update 6 Sep 2004. <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>.
- [21] Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64(15): 5245-50.
- [22] Zhijian Y, Zhen H, Fan Z, Jin Y, Qiwen D, Zhongming Z. Hepatitis B virus core protein with hot-spot mutations inhibit Mx<sub>A</sub> gene transcription but has no effect on inhibition of virus replication by interferon  $\alpha$ . *Virol J* 2010; 7: 278.
- [23] Wang Y, Wei L, Jiang D, Cong X, Fei R, Chen H, Xiao J, Wang Y. In vitro resistance to interferon-alpha of hepatitis B virus with basic core promoter double mutation. *Antiviral Res* 2007; 75(2): 139-45.
- [24] Wang Y, Wei L, Jiang D, Cong X, Fei R, Xiao J, Wang Y. In vitro resistance to interferon of hepatitis B virus with precore mutation. *World J Gastroenterol* 2005; 11(5): 645-55.
- [25] Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 47.
- [26] Santos AR, Duarte CB. Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2008; 86(16): 3684-92.
- [27] Toegel S, Huang W, Piana C, Unger FM, Wirth M, Goldring MB, Gabor F, Viernstein H. Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 13.
- [28] Gresner SM, Golanska E, Kulczycka-Wojdala D, Jaskolski DJ, Papierz W, Liberski PP.

- Selection of reference genes for gene expression studies in astrocytomas. *Anal Biochem* 2011; 408(1): 163-5.
- [29] Rho HW, Lee BC, Choi ES, Choi IJ, Lee YS, Goh SH. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer* 2010; 10: 240.
- [30] Chan PS, Caron JP, Orth MW. Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *J Rheumatol* 2006; 33(7): 1329-40.
- [31] Williams TK, Yeo CJ, Brody J. Does this band make sense? Limits to expression based cancer studies. *Cancer Lett* 2008; 271(1): 81-4.