ویرایش ژن LINC00511 با تکنیک نوین CRISPR/Cas9 و بررسی اثرات آن بر رده سلولی سرطان ریه

دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۱۵

نرجس آزاد بخت[۱]، عباس دوستی[۲*]، محمد سعید جامی[۳و ٤]

۱. دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران ۲. دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران ۳. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران ۴. استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان ریه، دومین سرطان شایع در جهان است. رده سلولی COR-L105 به‌عنوان یکی از معروف‌ترین رده‌های سلولی سرطان ریه در تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. RNAهای غیر کدکننده بلند (lncRNAs)، دسته‌ای از فاکتورهای مهم سلولی هستند که در فرآیندهایی نظیر رشد، تمایز، تکثیر، رونویسی، ترجمه و غیره نقش اساسی ایفا می‌کنند. نوعی lncRNA به نام LINC00511، یک تنظیم‌کننده رونویسی است و افزایش بیان آن در سرطان‌های مختلف گزارش شده‌است. هدف از این تحقیق حذف ژن LINC00511 با استفاده از تکنیک پیشرفته CRISPR/Cas9 در سلول‌های COR-L105 و بررسی اثرات آن بر پیشرفت سرطان و آپوپتوز است.

روش کار: در این تحقیق تجربی، دو نوع sgRNA برای ژن LINC00511 طراحی و در دو وکتور کریسپری به‌صورت جداگانه کلون شدند. با استفاده از لیپوفکتامین، دو وکتور حامل sgRNAها به سلول‌های COR-L105 منتقل شدند. پس از تأیید حذف ژن LINC00511 از سلول‌های هدف، میزان تغییرات در تکثیر سلولی و آپوپتوز با روش‌های MTT و فلوسیتومتری سنجیده شد. علاوه بر آن، بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و تومورزایی به‌روش real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: حذف ژن LINC00511 در اثر کریسپر، از ژنوم رده سلولی COR-L105 انجام شد. بیان ژن‌های BCL2، survivin، EZH2، c-MYC و MAX در سلول‌های تحت تیمار (ویرایش‌شده) نسبت به سلول‌های گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). افزایش بیان ژن‌های p21 و p57 نیز در سلول‌های ویرایش‌شده دیده شد ($p<۰/۰۵$). کاهش تکثیر سلولی و افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های دست‌ورزی شده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تخریب ژن LINC00511 در سلول‌های رده سرطان ریه سبب بروز آپوپتوز و کاهش تکثیر سلولی گردید. بنابراین به نظر می‌رسد، جلوگیری از بیان ژن LINC00511 در سلول‌های سرطانی، سبب کنترل تکثیر آنها می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کریسپر، سرطان ریه، RNA غیر کدکننده، آپوپتوز

* **نویسنده مسئول:** دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

ایمیل: abbasdoosti@yahoo.com **تلفن:** ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ **نمابر:** ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۹۹

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

مقدمه

سرطان ریه با بیش از ۲ میلیون مورد ابتلای جدید و ۱/۸ میلیون مرگ و میر در سال، به‌عنوان دومین سرطان شایع در جهان شناخته می‌شود. این سرطان، بیشترین میزان مرگ و میر در بین سرطان‌ها را در سال ۲۰۲۰ میلادی، به خود اختصاص داده‌است. در جوامع انسانی، از هر ۱۰ نفر، ۱ نفر به سرطان ریه مبتلا می‌شود و نرخ ابتلا به این سرطان در مردان حدود دو برابر زنان است (۱). سرطان ریه به دو گروه اصلی سرطان ریه سلول کوچک[1] (SCLC) و سرطان ریه غیر سلول کوچک[2] (NSCLC) تقسیم‌بندی می‌شود. گروه NSCLC، دربرگیرنده حدود ۸۵٪ از سرطان‌های ریه است که به انواع مختلف آدنوکارسینوما[3]، سلول‌های سنگ‌فرشی[4] (SqCC) و کارسینومای سلول بزرگ[5] (LCC)، دسته‌بندی می‌شوند (۲). سرطان ریه نوع NSCLC، معمولا به شیمی‌درمانی پاسخ نمی‌دهد و میزان زنده‌ماندن مبتلایان، در پنج سال پس از تشخیص بیماری، فقط ۵۰٪ است (۳).

عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی در بروز انواع سرطان‌ها نقش دارند. از عوامل ژنتیکی مؤثر در ایجاد یا پیشگیری از ابتلا به سرطان، RNAهای غیر کدکننده بلند (lncRNAs) هستند که در سال‌های اخیر نقش مولکولی برخی از آنها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. RNAهای غیر کدکننده بلند، رونوشت‌های مشابه mRNA هستند که اندازه آنها بین ۲۰۰ نوکلئوتید تا ۱۰۰ کیلو باز، متغیر است و در هسته یا سیتوپلاسم سلول حضور دارند (۴، ۵). یکی از RNAهای غیر کدکننده بلند که بیان آن در بیشتر بافت‌های بدن انسان دیده می‌شود، LINC00511 است. ژن مربوط به این RNA، روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ انسان در موقعیت کرومزومی 17q24.3، قرار دارد. LINC00511 بیشتر در هسته وجود دارد، ولی بیان سیتوپلاسمی آن نیز دیده شده‌است (۴).

RNA غیر کدکننده بلند LINC00511، یک تنظیم‌کننده رونویسی است و افزایش بیان آن در اکثر سرطان‌ها مانند: سرطان پانکراس (۴)، سرطان تخمدان (۵)، سرطان ریه (۶)، سرطان سینه (۷)، سرطان گلیوما (۸) و سرطان مثانه (۹) گزارش شده‌استRNAهای غیر کدکننده بلند، نقش‌های خود را بر اساس محل استقرارشان در سلول، انجام می‌دهند. مثلا lncRNAهای هسته‌ای، در فرایندهای رونویسی و انواع سیتوپلاسمی آنها در رویدادهایی نظیر ترجمه و مسیرهای سیگنال‌دهی، فعالیت می‌کنند. RNA غیر کدکننده بلند LINC00511، که در سرطان‌های متعددی دخیل است، در فرایندهای سیگنال‌دهی مختلفی از جمله Jak-STAT ، TGF-β و WNT/β-CATENIN، به ایفای نقش می‌پردازد. در سرطان ریه، عامل EZH2 با اتصال مستقیم به LINC00511، سبب خاموش‌شدن پروتئین P57 می‌گردد. این روند از مسیر سیگنال‌دهی TGF-β به اجرا در می‌آید و باعث سرکوب رونویسی p16، p21 و p19 نیز می‌گردد (۱۰، ۱۱). تحقیقات مختلف حاکی از نقش مؤثر LINC00511 در بروز یا پیشرفت انواع سرطان‌هاست. بررسی میزان بیان LINC00511 در بافت‌های بیماران مبتلا به سرطان ریه از نوع NSCLC، نشان‌دهنده افزایش قابل توجه بیان این RNA در بیماران نسبت به افراد نرمال است (۱۲). علاوه بر آن، محققان در سال ۲۰۱۸ با بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی شامل real time PCR، FISH و وسترن بلات نشان دادند که بیان بیش از حد LINC00511 در رده‌های سلولی سرطان پانکراس نسبت به سلول‌های نرمال، کاملا مشهود است. این افزایش بیان، با متاستاز به غدد لنفاوی و عود مجدد همراه است و باعث افزایش مهاجرت سلولی، تهاجم و رگ‌زایی می‌شود. از طرف دیگر، مهار بیان LINC00511، به‌طور مؤثر کاهش‌دهنده قدرت تهاجم سلولی است (۴). همچنین مهار LINC00511 سبب تسهیل فرآیند آپوپتوز می‌گردد.

مهار یا سرکوب یک ژن را می‌توان از راه‌های متعددی مثل: RNA مداخله‌گر، RNA سنجاق سری کوتاه، میکرو RNA، دی کویل‌ها، آپتامرها و کریسپر[6] انجام داد (۶، ۱۳). یکی از ابزارهای مهم برای ویرایش دقیق ژن‌ها، تکنیک کریسپر است. تکنیک کریسپر، از روش‌های ویرایش ژنوم بر پایه استفاده از نوکلئازهای هدایت‌شونده توسط RNA است. کشف و کاربرد تکنیک نوین کریسپر، انقلاب بزرگی در دست‌ورزی دقیق و کارآمد ژنوم انواع موجودات، پدید آورده‌است. در واقع در روش CRISPR/Cas9، یک RNA راهنما (sgRNA) که مکمل ناحیه‌ای از ژن هدف است، سبب هدایت آنزیم برش‌دهنده

[1] Small cell lung carcinoma
[2] Non-small cell lung carcinoma
[3] Adenocarcinoma
[4] Lung squamous cell carcinoma
[5] Large-cell carcinoma
[6] CRISPR

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

Cas9 به سمت ناحیه مکمل می‌شود و در آن ناحیه، ژن هدف بریده می‌شود (۱۴). هدف این تحقیق، ویرایش ژنوم رده سلولی سرطان ریه به نام COR-L105 بود. در این راستا، ژن RNA غیر کدکننده بلند LINC00511، به‌عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در بروز سرطان به‌روش CRISPR/Cas9، تخریب شد. سپس اثرات این تغییر ژنتیکی در فرآیندهای بیان ژن، آپوپتوز، تکثیر و مهاجرت سلولی در سلول‌های ویرایش شده، بررسی شد.

روش کار

کشت و نگهداری سلول ها

در این تحقیق تجربی–آزمایشگاهی، رده سلولی سرطان ریه COR-L105 مورد دستکاری ژنتیکی با تکنیک نوین ویرایش ژنومی CRISPR/Cas9، قرار گرفت. این رده سلولی از بانک سلولی ایران واقع در انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلولهای COR-L105 در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco، آمریکا) غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و همراه با ۱٪ مخلوط آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در فلاسک‌های T25 کشت داده‌شدند. شرایط رشد و نگهداری سلول‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ دی‌اکسیدکربن و ۹۵٪ رطوبت بود.

طراحی sgRNA ها و ایجاد سازواره ژنی

یکی از اهداف اصلی این تحقیق، حذف ژن LINC00511 از ژنوم رده سلولی سرطان ریه COR-L105 است. در این تحقیق، حذف ژن LINC00511، با تکنیک CRISPR/Cas9 انجام شد. برای این منظور ابتدا دو توالی RNA راهنما (single guide RNA: sgRNA) منطبق بر پروموتر و ناحیه اگزونی ژن LINC00511 با استفاده از نرم‌افزار CHOPCHOP، طراحی شد. توالی sgRNA1 به‌صورت 5'- AAAGGGTTGGTTAGTCACAA -3' و توالی sgRNA2 شامل 5'- GAGACCTTCGAAAAACGACG -3' بود.

هر یک از توالی‌های sgRNA1 و sgRNA2 به‌صورت جدا در وکتور کریسپری pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 ساخت شرکت Addgene آمریکا کلون شدند. نتیجه کلون‌سازی ژن، ایجاد دو وکتور نوترکیب بود که در اینجا به صورت PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 نام برده می‌شوند. به‌عنوان کنترل، از یک وکتور کریسپری دیگر که بیان‌کننده GFP (پروتئین سبز فلورسنت) بود و به شکل PX459-GFP نمایش داده‌می‌شود، استفاده شد. پلاسمید کریسپری مورد استفاده در این تحقیق، دارای پروموتر hU6 بوده و علاوه بر بیان RNAهای راهنما، قادر به تولید آنزیم برش‌دهنده Cas9 (CRISPR-associated protein 9) نیز می‌باشد. این وکتور دارای دو نشانگر انتخابی است؛ به‌طوری که ژن‌های مقاومت به آمپی‌سیلین و پورومایسین به‌ترتیب نشانگرهای انتخابی برای سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت هستند.

هر یک از وکتورهای نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 و وکتور کنترل PX459-GFP با استفاده از روش شیمیایی کلرید کلسیم (CaCl2) ۰/۱ مولار و شوک حرارتی به‌صورت جداگانه، به باکتری E.coli سویه TOP10 منتقل شدند. باکتری‌های دریافت‌کننده وکتور، در محیط کشت LB-Broth حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شده و تکثیر گردیدند. از باکتری‌های مذکور با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران)، تخلیص وکتورهای کریسپری نوترکیب صورت پذیرفت. برای تأیید درج یا کلون‌سازی RNAهای راهنما در وکتورهای کریسپری، از واکنش PCR بهره گرفته‌شد. از پرایمرهای hU6-F/P-LINC001-sg1 برای تأیید حضور sgRNA1 و از دو پرایمر hU6-F/P-LINC001-sg2 برای صحت کلون‌سازی sgRNA2 در وکتور PX459 استفاده شد (جدول ۱). تشکیل محصول PCR به اندازه ۲۷۶ جفت باز، مؤید حضور هر یک از sgRNAها در پلاسمیدهای کریسپری است.

ویرایش ژنوم رده سلولی سرطان ریه

در پی انتقال وکتورهای نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به رده سلولی سرطان ریه COR-L105، بخش بزرگی از پروموتر و اگزون ژن LINC00511 حذف می‌گردد. به این منظور، ترانسفکت‌کردن سلول سرطانی COR-L105، با کاربرد محلول تجاری لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (ترموفیشر، آمریکا) انجام شد. به این صورت که ابتدا در سه خانه از یک پلیت ۶ خانه، تعداد ۳۰۰ هزار سلول COR-L105 به ازای هر خانه، کشت داده‌شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰٪، بر اساس گروه‌بندی‌های زیر، انتقال وکتورها به سلول‌های مذکور صورت پذیرفت. به خانه اول وکتورهای نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 منتقل

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

شدند (گروه تیمار)، به خانه دوم وکتور کنترل PX459-GFP منتقل شد (گروه کنترل). به خانه سوم هیچ وکتوری منتقل نشد (گروه بلانک). پس از انجام ترانسفکشن، سلول‌های هر سه گروه در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر پورومایسین کشت داده‌شدند. پورومایسین، مارکر انتخابی وکتور کریسپری PX459 بوده و سلول‌های دریافت-کننده وکتور به پوروماسین مقاوم می‌شوند و در حضور آن زنده می‌مانند. علاوه بر آن، با انتقال وکتور PX459-GFP به سلول-ها، سلول‌های دریافت‌کننده آن، پس از مشاهده با میکروسکوپ رنگ سبز فلورسنت را نشان خواهند داد. این فنوتیپ نشان‌دهنده موفقیت لیپوفکشن و انتقال وکتورهای کریسپری به سلول‌های رده سرطان ریه است.

از طرف دیگر، در صورت فعالیت RNAهای راهنما در سیستم کریسپری طراحی‌شده در این تحقیق، بخش بزرگی از ژن LINC00511 از ژنوم سلول سرطانی ریه، حذف می‌گردد. برای تأیید حذف ژن در این سلول‌ها، از واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن LINC00511، بهره گرفته‌شد. ابتدا از سلول‌های مذکور (گروه تیمار و گروه کنترل)، استخراج DNA با استفاده از کیت تخلیص DNA (سیناکلون، ایران)، بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. سپس واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس PCR 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۰۳ نانومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA سلول و با افزودن آب مقطر، در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنشگرها در دستگاه PCR (اپندرف، آلمان) با برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در یک مرحله با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، تصویربرداری از ژل با دستگاه UVI tech (انگلستان)، صورت پذیرفت. در صورت فعالیت sgRNA1 و sgRNA2، یک ناحیه ۱۵۱۶ جفت بازی از ژن LINC00511 حذف می‌شود. پرایمرهای LINC-F و LINC-R برای دو طرف ناحیه مورد حذف طراحی شده‌اند (جدول ۱). طول محصول PCR حاصل از انجام واکنش با این پرایمرها برای سلول‌های نرمال (بدون حذف ژن) ۱۹۹۶ جفت باز خواهد بود. در صورت حذف ناحیه ۱۵۱۶ جفت بازی، تعداد ۴۸۰ جفت باز باقی می‌ماند. لذا در سلول‌هایی که سیستم کریسپری سبب ویرایش ژنی در آنها شده، محصول PCR برابر ۴۸۰ جفت باز خواهد بود. به طور خلاصه، به دست‌آمدن محصول PCR با اندازه ۴۸۰ جفت باز، نشان‌دهنده حذف ژن LINC00511 و مشاهده محصول ۱۹۹۶ جفت بازی، نشان‌دهنده عدم حذف ژن است.

تست تکثیر سلولی (MTT)

برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلول‌های COR-L105 آزمایش MTT انجام شد. بدین منظور تأثیر ویرایش ژن LINC00511 بر تکثیر رده سلولی سرطان ریه (گروه تیمار) در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل (پلاسمید خالی) و بلانک (فاقد پلاسمید) سنجیده شد. به‌طور خلاصه، برای انجام آزمایش MTT، هر یک از گروه‌های سلولی بالا در پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه، کشت داده‌شدند. بعد از ۲۴ ساعت و با رسیدن تراکم سلولی به ۸۰٪، محیط کشت روی سلول‌ها خارج و دو بار با بافر فسفاته نمکی شستشو انجام شد. سپس به هر خانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت سلولی RPMI بدون PBS همراه ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از محلول متیل تیازول تترازولیوم (سیگما، آلمان) اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شدند. سپس محلول روی سلول‌ها خارج شد و ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به هر خانه از پلیت، اضافه شد. نهایتاً جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه ELISA reader (Awareness Technology, PalmCity, FL, USA) اندازه‌گیری و با رسم نمودار استاندارد میزان تکثیر سلولی محاسبه گردید.

تعیین آپوپتوز با روش فلوسیتومتری

میزان مرگ سلولی در اثر پدیده‌های آپوپتوز و نکروز در سلول‌ها، ۴۸ ساعت پس از تیمار به روش فلوسیتومتری بررسی شد. در این آزمایش، میزان آپوپتوز سلولی به کمک Annexin V کونژوگه با فلوئوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) و میزان نکروز با PI (Propidium Iodide) تعیین می‌گردد. به این منظور از کیت Annexin-V-FITC /Propidium iodide Mab Taq (ترموفیشر، آمریکا) استفاده شد. به‌طور خلاصه تعداد

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

یک میلیون از هر یک از گروه‌های سلولی بالا در ۱ میلی‌لیتر از بافر 1X به نام Annexin-V binding buffer به‌صورت سوسپانسیون در آمد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شد و سپس ۵ میکرولیتر از محلول FITC Annexin V و ۵ میکرولیتر از محلول PI به هر لوله اضافه شد. لوله‌های فلوسیتومتری به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده‌شدند. در نهایت، مخلوط سلولی داخل لوله‌ها، جهت خوانش نهایی به داخل دستگاه فلوسایتومتری (ترموفیشر، آمریکا) منتقل و با طول موج ۷۰۰ نانومتر بررسی شدند.

بررسی بیان ژن

نظر به اینکه RNAهای غیر کدکننده بلند، نقش مهمی در فرآیندهای رشد سلول، رونویسی، ترجمه و آپوپتوز دارند، پس از حذف RNAهای غیر کدکننده بلند LINC00511 در سلولهای رده سرطان ریه COR-L105، میزان بیان ژن‌های مرتبط با سرطان و آپوپتوز در سلول‌های گروه تیمار و کنترل به‌صورت مقایسه‌ای بررسی شد. بیان ژن‌های p57، p21، Survivin، MAX، EZH2، c-MYC و BCL2 به روش real time RT-PCR ارزیابی گردید. در هر مرحله از واکنش، از ژن خانه‌داری GAPDH برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

ابتدا از سلول‌های گروه تیمار و گروه کنترل، استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناکون، ایران)، بر اساس دستورالعمل کیت، انجام شد. سپس سنتز DNA مکمل (cDNA) با کاربرد کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران)، صورت گرفت. برای سنجش میزان تغییرات بیان ژن‌ها به روشreal time RT-PCR، مخلوط واکنش‌گرها شامل ۷/۵ میکرولیتر از مستر SYBR Mix 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۰۳ نانومول) از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، مقدار ۱ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از cDNA و با افزودن آب مقطر، در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر آماده شد. برنامه دمایی در دستگاه real time PCR (کوربت، استرالیا) تنظیم گردید. برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، در ادامه ۴۵ سیکل به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها بر اساس جدول ۱ به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. در نهایت به‌منظور آنالیز منحنی ذوب، دمای دستگاه بین ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با طیف افزایش دمایی ۱ درجه سانتی‌گراد در هر ثانیه اجرا شد. داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن‌ها، با نرم‌افزار Rotor Gene 6000 در دستگاه real time PCR (کوربت، استرالیا) و به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز و بررسی شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمرها 3'----------5'	دمای اتصال
hU6	Hu6-F	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	۶۲
PX549-sgRNA1	P-LINC001-sg1	AAGACCTTGTGACTAACCAAC	۶۲
PX549-sgRNA2	P-LINC001-sg2	AAGACCCGTCGTTTTTCGAAG	۶۲
LINC00511	LINC-F LINC-R	CTCCTGTCACAGCCTCAGTG CTCGGCTGAGTCGCGTTC	۶۲
MAX	Max-F Max-R	TTGTGAATCTGAACTGCTCTACT CGACTCTGTGCTGCGAAT	۵۷
P57	P57-F P57-R	CTTCTTTGACCCTGACACC CTGAACATGGAGAGATAGTGC	۵۹
c-MYC	cM-F cM-R	GGAAGGGACAACACTAAGC GAGAGGAACACAGGAAAGC	۶۰
Survivin	Sur-F Sur-R	GAGAACGAGCCAGACTTGG GCTTTCCTTTCTGTCAAGAAGC	۶۲
BCL2	BCL2-F BCL2-R	TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG TACAGTTCCACAAAGGCATCC	۵۸
P21	P21-F P21-R	ACTGTCTTGTACCCTTGTGC CTTCCTCTTGGAGAAGATCAGC	۵۸
EZH2	EZH2-F EZH2-R	GTTAACGGTGATCACAGGATAGG CGATGCCGACATACTTCAGG	۵۸
GAPDH	GDH-F GDH-R	GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC	۶۲

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

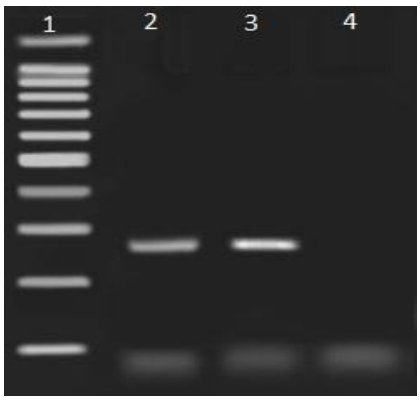
آنالیز داده‌ها

تست‌ها به‌صورت سه بار تکرار بود و نتایج به صورت میانگین± انحراف‌معیار به‌دست آمد. به‌منظور آنالیز آماری، تغییرات بین رده سلولی ترانسفورم‌شده و گروه شاهد، از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد. سپس نتایج به دست‌آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شد. برای بررسی ارتباط معنادار و میزان آن از آزمون‌های LSD استفاده شد. نمودارهای مورد نیاز به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism رسم گردید. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تأیید ایجاد وکتور کریسپری نوترکیب

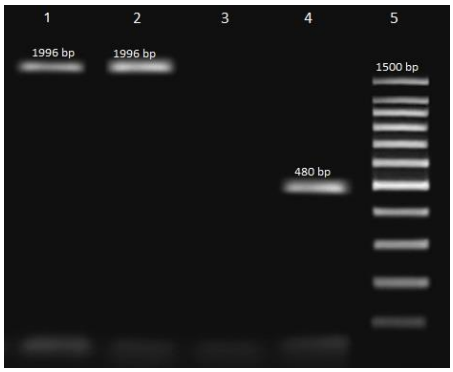
برای تأیید حضور قطعات RNA راهنما (sgRNAs) در وکتور کریسپری PX459، از روش PCR با کاربرد پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. از آنجا که پرایمر فوروارد از روی ژن hU6 موجود در بدنه وکتور طراحی شد و پرایمر ریورس شامل مکمل هر یک از sgRNAهای ۱ و ۲ بود، از طرف دیگر طول هر sgRNA برابر ۲۰ نوکلئوتید است، لذا انجام PCR روی هر یک از وکتورهای کریسپری نوترکیب PX459-sgRNA1 وPX459-sgRNA2 سبب تشکیل باند ۲۷۶ جفت بازی گردید. نتیجه ژل الکتروفورز محصولات PCR در این مرحله، در شکل ۱ نشان داده شده‌است.



شکل ۱. نتایج کلونینگ sgRNA های ۱ و ۲ در وکتور کریسپری Px459. شماره ۱، مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت سیناکلون. شماره ۲ و ۳ به ترتیب واکنش PCR روی وکتورهای نوترکیب PX459-sgRNA1 وPX459-sgRNA2 که سبب تشکیل باند ۲۷۶ جفت بازی گردیده‌است. شماره ۴، کنترل منفی PCR (بدون DNA)

نتایج ویرایش ژن LINC00511 رده سلولی سرطان ریه

پس از انتقال توأم دو وکتور کریسپری نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به رده سلول‌های سرطان ریه COR-L105، در اثر فعالیت آنزیم Cas9، محل اتصال RNAهای راهنما به ژن هدف، بریده شد. با توجه به اینکه فاصله بین محل اتصال دو RNA راهنمای sgRNA1 و sgRNA2، ۱۵۱۶ جفت باز می باشد، بنابراین قطعه‌ای به اندازه ۱۵۱۶ جفت باز از درون ژن LINC00511 حذف شد. جهت تأیید حذف قطعه، یک جفت پرایمر برای نواحی فرادست و فرودست منطقه حذف‌شده طراحی شد. خلاصه آنکه با انجام PCR، در سلول‌های نرمال (بدون حذف ژن)، محصولی به طول ۱۹۹۶ جفت باز حاصل شد و در سلول‌های ویرایش‌شده، پس از حذف ناحیه ۱۵۱۶ جفت بازی از درون ناحیه ۱۹۹۶ جفت بازی، محصولی به اندازه تقریبی ۴۸۰ جفت باز، به‌وجود آمد. از آنجا که سلول‌هایی که دچار برش ژن توسط سیستم کریسپر می-گردند، فعالیت خود را جهت ترمیم منطقه برش خورد آغاز می-کنند، بنابراین اندازه محصول PCR در سلول‌های ویرایش ژن-شده، دقیقا ۴۸۰ جفت باز نخواهد بود و اندکی متفاوت است. علاوه بر آن، در دو گروه سلول شامل سلول‌های کنترل (حاوی وکتور دارای GFP) و سلول‌های بلانک (فاقد پلاسمید)، محصول PCR به اندازه ۱۹۹۶ جفت باز تشکیل شد (شکل ۲).



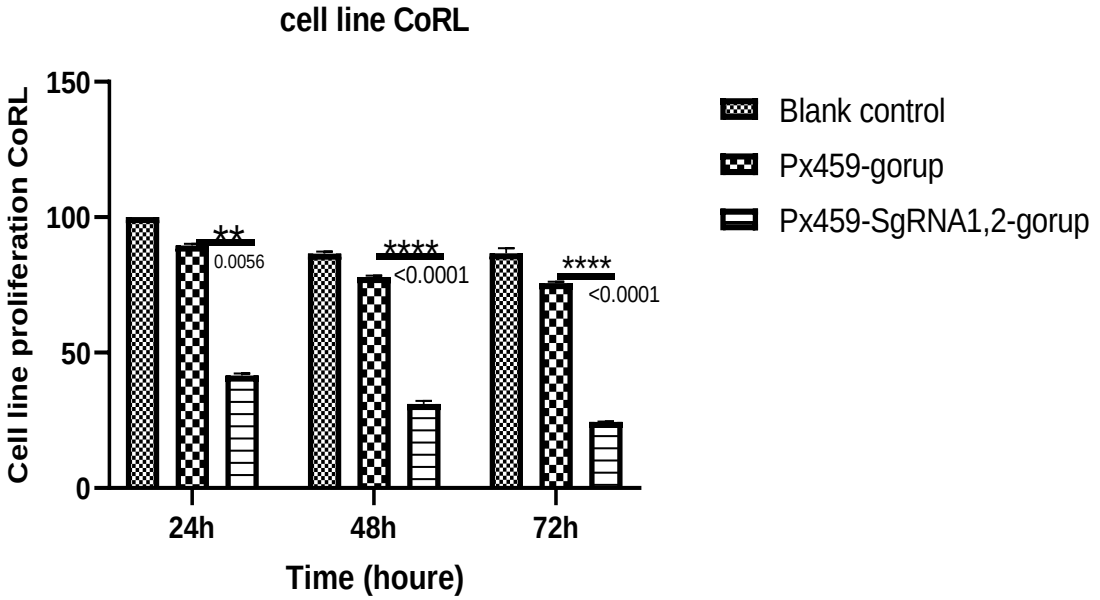
شکل ۲. واکنش PCR برای تأیید ویرایش ژن LINC00511 در سلول‌های رده سرطان ریه. شماره‌های ۱ و ۲ به ترتیب واکنش PCR روی سلول‌های کنترل و بلانک که باند ۱۹۹۶ جفت بازی را نشان می‌دهند. شماره ۳، کنترل منفی (بدون DNA). شماره ۴، واکنش PCR روی سلول تیمارشده که بخشی از ژن LINC00511 در اثر فعالیت کریسپری حذف شده‌است و محصول PCR به اندازه ۴۸۰ جفت باز را نشان می دهد. شماره ۵، مارکر ۱۰۰ جفت بازی سیناکلون.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

نتایج MTT

میزان تکثیر هر سه گروه سلول مورد آزمایش، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انتقال وکتورها، با روش MTT بررسی شد. سرعت تکثیر سلول‌ها در گروه سلول‌های گروه تیمار (ویرایش ژن‌شده)، نسبت به دو گروه دیگر شامل گروه کنترل (پلاسمید خالی) و بلانک (فاقد پلاسمید)، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش تکثیر در سلول‌های سرطانی حاضر در گروه دریافت‌کننده وکتورهای کریسپری در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد و سطح معنی‌داری به ترتیب کمتر از ۰/۰۱، ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ بود. نتایج حاصل در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. بیشترین کاهش در رشد و تکثیر سلول‌ها در زمان ۷۲ ساعت مشهود است.



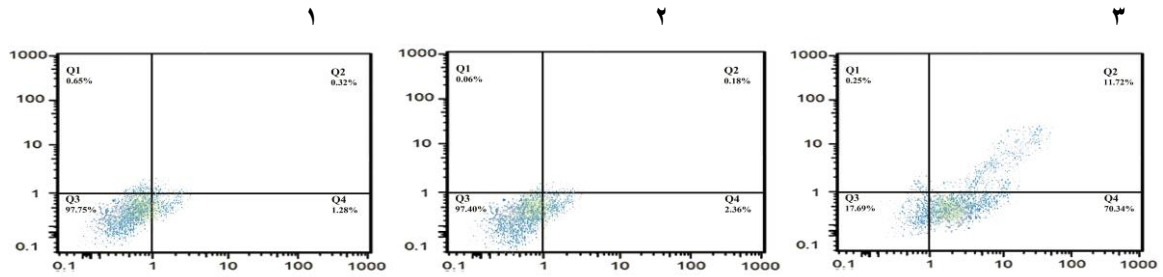
شکل ۳. بررسی تکثیر سلول‌های COR-L105 به روش MTT بعد از ویرایش ژن LINC00511. تکثیر سلول‌های گروه تیمار (حذف ژن‌شده) نسبت به سلول‌های گروه کنترل و گروه بلانک در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به‌طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد.

نتایج بررسی آپوپتوز و نکروز

بر پایه نتایج حاصل از فلوسیتومتری و نمودارهای نشان داده‌شده در شکل ۴، درصد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های گروه تیمار در مقایسه با گروه‌های کنترل و بلانک به صورت زیر نشان‌داده شده‌است. در سلول‌های COR-L105 گروه تیمار (دریافت‌کننده sgRNA) درصد آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه، سلول‌های زنده و سلول‌های دچار نکروز به ترتیب ۷۰/۳۴، ۱۱/۷۲، ۱۷/۶۹ و ۰/۲۵ است. درصد آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه سلول‌های زنده و سلول‌های دچار نکروز در سلول‌های گروه کنترل (پلاسمید خالی)، به ترتیب ۲/۳۶، ۰/۱۸، ۹۷/۴۰، ۰/۰۶ و در گروه سلولی بلانک (فاقد پلاسمید) ۱/۲۸، ۰/۳۲، ۹۷/۷۵ و ۰/۶۵ است. از طرف دیگر مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول‌های گروه تیمار، گروه کنترل و گروه بلانک به ترتیب ۸۲/۰۲٪، ۲/۵۴٪ و ۱/۶۰٪ است. بنابراین نتایج فلوسیتومتری روی سلول‌های سرطانی COR-L105 نشان می‌دهد که ویرایش و خاموش‌کردن ژن LINC00511 در این سلول‌ها، سبب افزایش آپوپتوز و کاهش سلول‌های سرطانی زنده می‌شود.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

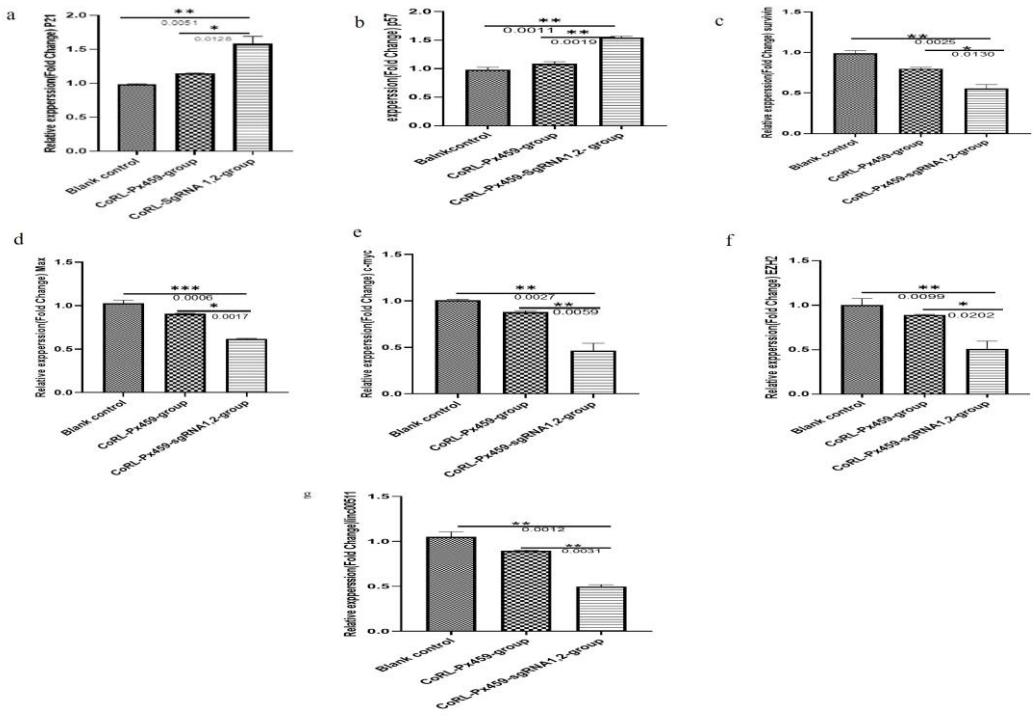
[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]



شکل ٤. نتایج حاصل از فلوسایتومتری برای بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های رده سرطان ریه COR-L105. نمودار ۱: سلول‌های گروه بلانک (فاقد پلاسمید). نمودار ۲: سلول‌های گروه کنترل. نمودار ۳: سلول‌های گروه تیمار.
Q1: درصد سلول‌های نکروز شده؛ Q2: درصد سلول‌های آپوپتوز ثانویه؛ Q3: درصد سلول‌های زنده؛ Q4: درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه

نتایج بیان نسبی ژن‌های مرتبط با آپوپتوز

بیان تعدادی از ژن‌های پروآپوپتوزی مانند p57 و p21 و ژن‌های آنتی آپوپتوزی Survivin و BCL2 و ژن‌های مؤثر در رشد و تنظیم چرخه سلولی شامل MAX، c-MYC و EZH2 در سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل و سلول‌های بلانک به روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد. آنالیز نمودارهای حاصل از real time PCR نشان داد در سلول‌های رده سرطان ریه COR-L105 که توسط دو وکتور کریسپری نوترکیب PX459-sgRNA1 وPX459-sgRNA2، ترانسفکت شده‌اند، پس از تخریب ژن LINC00511، بیان ژن‌های Survivin، BCL2، MAX، c-MYC و EZH2 کاهش معنی‌داری نسبت به سلول‌های کنترل دارند. از طرف دیگر، بیان دو ژن پروآپوپتوزی p57 و p21 در سلول‌های COR-L105 تیمارشده (حذف ژن‌شده)، نسبت به سلول‌های کنترل، به‌صورت معنی‌داری افزایش بیان نشان می‌دهند (شکل ۵).



شکل ۵. نتایج بررسی تغییرات بیان ژن‌ها به روش Real time PCR در رده سلولی COR-L105 حاوی پلازمید Px459-sgRNA1,2 در مقایسه با سلول‌های خالی و پلازمید بدون sgRNA

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

بحث

در این تحقیق برای اولین بار، نقش ژن LINC00511 در فرایندهای سلولی نظیر تکثیر، آپوپتوز و بیان ژن‌های مرتبط با سرطان‌زایی و آپوپتوز در سلول‌های رده سرطان ریه COR-L105 با تکنیک نوین ویرایش ژن به نام کریسپر بررسی شد. طبق نتایج، میزان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های دست‌ورزی‌شده (ویرایش ژن‌شده) کاهش معنی‌داری نسبت به سلول‌های کنترل نشان داد. بر اساس نتایج فلوسایتومتری میزان آپوپتوز اولیه و ثانویه به‌طور معنی‌داری در سلول‌های تیمارشده نسبت به سلول‌های کنترل و بلانک افزایش پیدا کرد. به دلیل استفاده از لیپوفکتامین افزایش آپوپتوز اولیه و ثانویه و همچنین سلول‌های نکروزشده در گروه کنترل نسبت به گروه بلانک مشاهده گردید. حذف ژن LINC00511 باعث افزایش بیان در ژن‌های پرو آپوپتوزی p21 و p57 و کاهش بیان در ژن‌های آنتی آپوپتوزی Survivin، BCL2 و ژن‌های مؤثر در رشد و تنظیم چرخه سلولی شامل MAX، c-MYC و EZH2 شده‌است. نتایج حاصل از حذف ژن با روش کریسپر موفقیت‌آمیز گزارش شد. همسو با نتایج تحقیقات پیشین، نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق حاکی از افزایش بیان معنی‌دار LINC00511 در سلول‌های سرطان ریه نسبت به سلول‌های نرمال بود که تأکیدی بر نقش انکوژنی آن می‌باشد.

در تأیید مطالعات قبلی، برهم کنش RNA غیر کدکننده بلند LINC00511 با فاکتورهای پروآپوپتوتیک مانند p21 و p57 مشخص گردیده و مهار آنها باعث القای تومورزایی گردید. چنین تأثیری از طریق برهم‌کنش مستقیم فاکتور تومورزای EZH2 با LINC00511 و مهار p57 از طریق اختلال در ناحیه پروموتری در سلول‌های سرطانی NSCLC و نهایتاً القای تکثیر این سلول‌ها رخ می‌دهد (۱۳، ۱۵). در سلولهای سرطانی تخمدان نیز مهار p21 از طریق برهم‌کنش EZH2 با LINC00511 رخ می‌دهد که به نقش انکوژنی این lncRNA دلالت دارد (۱۶). در تأیید نتایج مطالعات پیشین، میزان بیان LINC00511 همبستگی مثبت با اندازه توده تومور و متاستازی در لاین‌های سلولی NSCLC نشان داد. به‌طور جالب توجهی بیان فاکتور MAX بعد از خاموشی LINC00511 در سلولهای سرطانی نسبت به سلول‌های کنترل کاهش پیدا کرد. MAX و c-MYC به‌صورت هترودایمر به موتیف E-box در DNA متصل می‌شوند و به‌عنوان مرکز اتصال برای پروتئین‌های دیگر عمل می‌کنند. غیر فعال‌شدن MAX و پروتئین‌های مرتبط به آن (MGA) در NSCLC و SCLC گزارش شده‌است (۱۷).

خاموشی LINC00511 با روش کریسپر انجام و کاهش بیان معنی‌داری در سلول‌های دست ورزی‌شده را نشان داد. در کاهش بیان LINC00511 در سلول‌های سرطانی سینه از طریق siRNA منجر به افت میزان تکثیر و متاستاز آنها گردید و نقش آن به‌طور غیرمستقیم و از طریق برهم‌کنش با miR-150 در القای تومورزایی مشخص گردید (۱۸). Wang و همکاران از طریق خاموشی این lncRNA در سلول‌های سرطانی معده به‌طور مشابه کاهش در تکثیر، قدرت تهاجمی، رشد تومور و افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها را مشاهده کردند. همچنین عملکرد LINC00511 به‌عنوان مداخله‌گر و برهم‌کنش آن با RNAهای دیگر مانند miRNA مشخص شده‌است (۱۹). در واقع این lncRNA از طریق برهم‌کنش و دخالت در شبکه بیانی RNAهای دیگر نقش مختلف خود را ایفا می‌کند. به‌عنوان مثال از طریق کم‌کردن فعالیت miR-29b-3p در سرطان پانکراس میزان بیان VEGFA را کنترل می‌کند (۵). LINC00511 در سلول‌های آدنوکارسینوما (LUAD) از طریق غیر فعال‌کردن miR-185-3p که در کنترل MECP2 نقش دارد، چرخه سلولی را تنظیم می‌کند. به‌عبارت دیگر بیان بالای آن با مرحله TMN و متاستاز گره لنفاوی در این سلول‌ها مرتبط است و همچنین با توسعه فاز S و کاهش فاز G1 تکثیر آنها را تسریع می‌بخشد. به همین خاطر خاموشی بیان آن منجر به کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلول‌های توموری LUAD می‌گردد (۲۰). در این راستا هدف‌گیری LINC00511 از طریق shRNA (Short hairpin RNA) در سلول‌های سرطانی ریه از نوع سنگفرشی باعث افزایش بیان miR-150-5p و کاهش تکثیر سلول‌ها شد (۲۱). خاموشی این lncRNA در سلول‌های سرطان معده نیز منجر به افزایش آپوپتوز و کاهش تکثیر گشت. در واقع نقش آن به‌عنوان تداخلگر مولکولی در فعالیت miR-124-3p و miR-29b باعث افزایش فعالیت ژن PDK4 و KDM2A در پایین‌دست و نهایتاً تکثیر این سلول‌ها می‌گردد. البته بیان بیش از حد PDK4 و KDM2A باعث جبران عدم فعالیت LINC00511 در سرطان معده نیز شد (۲۲، ۲۳). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که LINC00511 نقش انکوژن در سلول‌های تومورزایی سرطان ریه ایفا می‌کند.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

مکان‌یابی داخل سلولی lncRNAها مسیر شناخت مکانسیم‌های مولکولی آنها را هموارتر می‌کند. از طریق این روش می‌توان به نقش آنها در سطح رونویسی، ترجمه یا تغییرات پس از ترجمه پی برد. استفاده از سیستم به‌عنوان تکنولوژی جدید، راهکار مؤثر و مقرون به‌صرفه‌ای را در بررسی نقش ژن‌های کارکردی و همچنین RNAهای غیر کدشونده در بیماری‌های مختلف مانند سرطان در شرایط آزمایشگاهی، فراهم کرده‌است. در بیشتر مواقع، سرطان ریه در مراحل بسیار پیشرفته تشخیص‌داده می‌شود. NSCLC بیش از ۸۵٪ از سرطان‌های ریه را شامل می‌شود. هرچند شیمی‌درمانی، گزینه درمانی مناسب برای درمان این گروه از مبتلایان به سرطان ریه است؛ اما در بهترین شرایط نرخ پاسخ بیمار به شیمی‌درمانی ۳۰٪ تا ۵۰٪ است. این پاسخ ضعیف به شیمی‌درمانی منجر به شکست در روند بهبود و درمان بیمار می‌شود. با توجه به نکات فوق می‌توان از روش‌های جایگزین دیگری برای تسریع در تشخیص و همچنین درمان بیماران مبتلا استفاده کرد. از جمله این روش‌ها می‌توان به تکنیک نوین کریسپر اشاره نمود. نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان داد که یکی از راه‌های مؤثر در کنترل تکثیر سلول‌های سرطانی ریه، غیر فعال‌سازی ژن LINC00511 است. از آنجا که تکنیک کریسپر با طراحی دقیق و سیستم پیشرفته‌ای که دارد می‌تواند بدون آسیب به سایر ژن‌ها، یک ژن خاص را ویرایش نماید، لذا کاربرد آن در هدف قراردادن ژن‌های مؤثر در پیشرفت سرطان و متاستاز می‌تواند آینده روشنی پیش روی محققان در راستای کنترل بیماری مهلک سرطان قرار دهد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، ابتدا ژن RNA غیر کدکننده بلند LINC00511 با روش مولکولی جدید کریسپر حذف گردید و نتایج آزمایش‌ها نشان‌دهنده حذف موفقیت‌آمیز این ژن از درون ژنوم سلول‌های رده سرطان ریه به نام COR-L105 بود. اثرات حذف ژن LINC00511 در سلول‌های سرطانی موردمطالعه، نشان‌دهنده کاهش تکثیر سلولی و القای آپوپتوز بود که گامی مؤثر در کنترل رشد توده سرطانی محسوب می‌شود. ازآنجاکه در این تحقیق برای اولین بار اثرات ژن LINC00511 در سرطان ریه بررسی گردیده‌است، به نظر می‌رسد حذف ژن LINC00511 با تکنیک ویرایش ژنی کریسپر، روش مناسبی جهت کنترل سلول‌های توموری ریه باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دکترای تخصصی رشته ژنتیک مولکولی است که با کد اخلاق IR.IAU.SHK.1399.0017 تصویب گردیده‌است. از حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه و اعضای محترم کمیته اخلاق برای مساعدت در تصویب و اجرای این تحقیق کمال تشکر داریم.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a Cancer Journal for Clinicians. 2021; 71(3):209-49.
2. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. Frontiers in Oncology. 2017; 7:193-98.
3. Cao F, Wang Z, Feng Y, Zhu H, Yang M, Zhang S, et al. lncRNA TPTEP1 competitively sponges miR-328-5p to inhibit the proliferation of non-small cell lung cancer cells. Oncology Reports. 2020; 43(5):1606-18.
4. Zhao X, Liu Y, Li Z, Zheng S, Wang Z, Li W, et al. Linc00511 acts as a competing endogenous RNA to regulate VEGFA expression through sponging hsa-miR-29b-3p in pancreatic ductal adenocarcinoma. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2018; 22(1):655-67.
5. Wang J, Tian Y, Zheng H, Ding Y, Wang X. An integrated analysis reveals the oncogenic function of lncRNA LINC00511 in human ovarian cancer. Cancer Medicine. 2019; 8(6):3026-35.
6. Sun CC, Li SJ, Li G, Hua RX, Zhou XH, Li DJ. Long intergenic noncoding RNA 00511 acts as an oncogene in non–small-cell lung cancer by binding to EZH2 and suppressing p57. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2016; 5 (11):e385.
7. Lu G, Li Y, Ma Y, Lu J, Chen Y, Jiang Q, et al. Long noncoding RNA LINC00511 contributes to breast cancer tumourigenesis and stemness by inducing the miR-185-3p/E2F1/Nanog axis. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 2018; 37(1): 289-99.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

8. Li C, Liu H, Yang J, Yang J, Yang L, Wang Y, et al. Long noncoding RNA LINC00511 induced by SP1 accelerates the glioma progression through targeting miR-124-3p/CCND2 axis. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2019; 23(6):4386-94.
9. Li J, Li Y, Meng F, Fu L, Kong C. Knockdown of long non-coding RNA linc00511 suppresses proliferation and promotes apoptosis of bladder cancer cells via suppressing Wnt/β-catenin signaling pathway. Bioscience Reports. 2018; 38(4): BSR20171701.
10. Lin S, Zhen Y, Guan Y, Yi H. Roles of Wnt/β-catenin signaling pathway regulatory long non-coding RNAs in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. Cancer Management and Research. 2020; 12:4181-91.
11. Zhu F, Zhang S, Wang L, Wu W, Zhao H. LINC00511 promotes the progression of non-small cell lung cancer through downregulating LATS2 and KLF2 by binding to EZH2 and LSD1. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2019; 23(19):8377-90.
12. Su M, Xiao Y, Tang J, Wu J, Ma J, Tian B, et al. Role of lncRNA and EZH2 interaction/regulatory network in lung cancer. Journal of Cancer. 2018; 9(22):4156-65.
13. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature. 2012;482(7385):331-8.
14. Hryhorowicz M, Lipinski D, Zeyland J, Słomski R. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 2017; 65(3):233-40.
15. Madani GK, Rad A, Molavi M, Khales SA, Abbaszadegan MR, Forghanifard MM. Predicting the correlation of EZH2 and cancer stem cell markers in esophageal squamous cell carcinoma. Journal of Gastrointestinal Cancer. 2018; 49(4):437-41.
16. Romero OA, Torres-Diz M, Pros E, Savola S, Gomez A, Moran S, et al. MAX inactivation in small cell lung cancer disrupts MYC–SWI/SNF programs and is synthetic lethal with BRG1. Cancer Discovery. 2014; 4(3):292-303.
17. Shi G, Cheng Y, Zhang Y, Guo R, Li S, Hong X. Long non-coding RNA LINC00511/miR-150/MMP13 axis promotes breast cancer proliferation, migration and invasion. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2021;1867(3):165957.
18. Wang D, Liu K, Chen E. LINC00511 promotes proliferation and invasion by sponging miR-515-5p in gastric cancer. Cellular and Molecular Biology Letters. 2020; 25:4-10.
19. Han X, Wu J, Zhang Y, Song J, Shi Z, Chang H. LINC00518 promotes cell proliferation by regulating the cell cycle of lung adenocarcinoma through miR-185-3p targeting MECP2. Frontiers in Oncology. 2021; 11: 81-92.
20. Wu Y, Li L, Wang Q, Zhang L, He C, Wang X, et al. LINC00511 promotes lung squamous cell carcinoma proliferation and migration via inhibiting miR-150-5p and activating TADA1. Translational Lung Cancer Research. 2020; 9(4):1138-48.
21. Sun CB, Wang HY, Han XQ, Liu YN, Wang MC, Zhang HX, et al. LINC00511 promotes gastric cancer cell growth by acting as a ceRNA. World Journal of Gastrointestinal Oncology. 2020; 12(4):394-404.
22. Zhao Y, Chen X, Jiang J, Wan X, Wang Y, Xu P. Epigallocatechin gallate reverses gastric cancer by regulating the long noncoding RNA LINC00511/miR-29b/KDM2A axis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2020; 1866(10):165856.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]

Editing of LINC00511 gene with a new CRISPR/Cas9 technique and evaluation of its effects on lung cancer cell line

Received: 1 Jun 2021 Accepted: 6 Sep 2021

Narjes Azadbakht [1], Abbas Doosti [2*], Mohammad-Saeid Jami [3]

1. PhD Student at Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran 2. Associate Professor at Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran 3. Assistant Professor at Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran 4. Assistant Professor at Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Abstract

Introduction: Lung cancer is the second most common cancer in the world. The COR-L105 cell line is used as one of the most popular lung cancer cell lines in various studies. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a group of important cellular factors that play a key role in many processes such as growth, differentiation, replication, transcription, translation. LncRNA LINC00511 is a transcriptional regulator and has been reported to increase its expression in various cancers. The aim of this study was to knockout the LINC00511 gene using a CRISPR/Cas9 in COR-L105 cells and to investigate its effects on cancer progression and apoptosis.

Methods: In this experimental study, two sgRNAs were designed for LINC00511 gene and cloned into two CRISPR vectors, separately. Two sgRNAs vectors were transferred to COR-L105 cells using lipofectamine. After confirmation of LINC00511 gene knockout from target cells, changes in cell proliferation and apoptosis were assayed by MTT and flow cytometry. Furthermore, the expression of genes associated with apoptosis and tumorigenesis was examined by real-time PCR.

Results: LINC00511 gene knockout from COR-L105 cell line was performed. The expression of BCL2, survivin, EZH2, c-MYC, and MAX genes showed a meaningful decrease related to the expression in treated cells (edited) compared to the control cells ($p<0.05$). Increased expression of p21 and p57 genes was also seen in the edited cells ($p<0.05$). Decreased cell proliferation and increased apoptosis were observed in manipulated cells.

Conclusion: Knocking of LINC00511 gene in lung cancer cell line caused apoptosis and decreased cell proliferation. Therefore, inhibiting the expression of the LINC00511 gene in cancer cells leads to the control their proliferation.

Keywords: CRISPR-Cas9, Lung cancer, Non-coding RNAs, Apoptosis

***Corresponding Author:** Associate Professor at Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Email: abbasdoosti@yahoo.com **Tel:** +989133838830 **Fax:** +983833361099

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.25382810.1400.8.2.5.6]