

## بررسی اثرات بیان پروتئین فیبرومودلین بر روی مسیرهای پیام رسانی NFkB و TGFβ در سلول‌های سرطان کبد

سارا سادات خاتمی<sup>۱</sup> (M.Sc)، فاطمه توکلی<sup>۲</sup> (M.Sc)، حسین باقری<sup>۱</sup> (M.Sc)، رضا سالار نیا<sup>۳</sup> (Ph.D)، امیررضا حصاری<sup>۱</sup> (M.Sc)، فائزه قاسمی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۶

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۱۵۰۱ ghasemi\_808@yahoo.com

### چکیده

هدف: میزان بروز سرطان کبد به طور پیوسته در حال افزایش است. در حال حاضر، ژن درمانی برای بهبود چالش‌های پزشکی گوناگونی از جمله درمان سرطان مورد بررسی قرار می‌گیرد. فیبرومودلین از طریق تعامل با فاکتورهای رشد و رستورهای مسیرهای پیام‌رسانی در بسیاری از فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیکی دخالت می‌نماید. این مطالعه با هدف بررسی اثرات بیان ژن فیبرومودلین بر روی مسیرهای پیام‌رسانی NFkB و TGFβ در سلول‌های سرطان کبد با رویکرد بررسی ژن‌های مسیرهای مولکولی درگیر در این سرطان انجام شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های سرطان کبد انسانی Huh-7 کشت داده شد و اثر تیمار با فیبرومودلین بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها با استفاده از تست MTT سنجیده شد. سپس با استفاده از لیپوفکتامین، ژن فیبرومودلین را به داخل سلول‌ها ترانسفکت کرده و بیان ژن‌های SMAD2/3 و TGFβ را با استفاده از روش Real time-PCR مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها: تأثیر فیبرومودلین بر بیان ژن‌های TGFβ و SMAD2/3 در رده‌ی سلولی سرطان کبد انسانی Huh-7 بررسی شد. نتایج نشان داد فیبرومودلین موجب تنظیم کاهشی این ژن‌ها در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن فیبرومودلین در مقایسه با سلول‌های کنترل گردید. همچنین نتایج MTT نشان داد که تیمار با فیبرومودلین موجب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های Huh-7 به طریق وابسته به دوز می‌شود.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد فیبرومودلین به طور معناداری میزان بیان ژن‌های مسیر TGFβ و NFkB را در سلول‌های سرطان کبد کاهش داد. همچنین تیمار رده‌ی سلولی سرطان کبد با فیبرومودلین سبب افزایش رشد سلول‌ها گردید. به نظر می‌رسد ژن فیبرومودلین دارای اثرات ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطان کبد است.

واژه‌های کلیدی: سرطان‌های کبد، فیبرومودلین، مسیر پیام‌رسانی NF-kappa B، عامل بتای رشد متغیر

### مقدمه

زده شده است [۳]. در مقایسه با سایر نقاط جهان، در کشورهای فقیرتر میزان کشندگی ناشی از سرطان کبد تا حدود ۴۰٪ بیش‌تر است که از دلایل آن می‌توان به فقدان پیشگیری مناسب، تشخیص زودهنگام و راهکارهای درمانی مفید اشاره نمود [۵،۴]. ژن‌درمانی به صورت درمان یک اختلال یا بیماری از طریق انتقال دادن مواد ژنتیکی به داخل سلول‌ها تعریف می‌شود. در حال حاضر، ژن‌درمانی توجه بسیاری را به خود معطوف نموده است و برای بهبود چالش‌های پزشکی گوناگونی از جمله درمان سرطان مورد بررسی قرار گرفته است [۶]. فیبرومودلین (کراتان سولفات پروتئوگلیکان) از اعضای خانواده‌ی SLRP

سرطان کبد هفتمین سرطان رایج و چهارمین عامل مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان در سراسر دنیا می‌باشد [۱]. میزان بروز سرطان کبد در هر دو جنس به طور پیوسته در حال افزایش است [۲]. مطابق با تخمین انجمن ملی سرطان آمریکا در سال ۲۰۱۹، ۴۲۰۳۰ مورد جدید ابتلا به این سرطان و ۳۱۷۸۰ مورد مرگ و میر مرتبط با آن (۲۱۶۰۰ مورد در مردان و ۱۰۱۸۰ مورد در زنان) در ایالات متحده‌ی آمریکا رخ خواهد داد. متوسط میزان بقای ۵ ساله برای این سرطان ۱۸٪ تخمین

انسانی می‌تواند در ترکیب با درمان‌های دیگر به خصوص شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی موجب کاهش خصوصیات تهاجمی تومور و در نهایت افزایش شانس بقا در بیماران شود.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1396.303

از دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد.

مواد. رده سلولی Huh-7 (سلول سرطان کبد انسانی) از انستیتو پاستور ایران سفارش داده شد. سفارش توالی ژن فیرومودلین (pCMV6-AC-GFP, mammalian vector with C-terminal tGFP tag, 10ug) به شرکت - Origene آمریکا داده شد. لیپوفکتامین (Thermo Fisher Scientific) (US) تهیه گردید. این پژوهش با کد اخلاق ۱۳۹۶،۳۰۳ IR.ARAKMU.REC. توسط کمیته اخلاق پژوهشی

دانشگاه علوم پزشکی اراک به تصویب رسید.

کشت و نگهداری رده سلولی سرطان کبد. سلول‌های Huh-7 (سلول سرطان کبد انسانی) در محیط DMEM حاوی ۱۰٪v/v سرم جنین گاو که قبلاً غیر فعال شده است، به علاوه بنی‌سیلین (۱۰۰u/m) و استرپتومایسین (۱۰۰mg/ml) کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪CO<sub>2</sub> نگهداری شدند. محیط سلولها هر دو روز یکبار تعویض شد.

آزمون MTT. سفارش توالی ژن فیرومودلین به شرکت Origene-آمریکا داده شد. بر اساس پروتکل موجود در کیت با استفاده از آب مقطر استریل حل گردید و در فریز -۷۰ درجه نگهداری گردید. در یک پلیت ۹۶ خانه، تعداد ۱×۱۰<sup>۴</sup> سلول Huh-7 به ازای هر چاهک قرار داده شد بعد از کشت سلولها و رسیدن به تراکم ۷۰٪، رقت‌های مختلف ترکیب فیرومودلین ۴-۶-۸-۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به هر چاهک اضافه می‌کنیم. و در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از انکوباسیون‌های مناسب معرف MTT (۳- (۴و ۵) - دی متیل تیا زول - ۲- (ایل) - ۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم بر مایند) به هر خانه اضافه شد. جذب توسط دستگاه الایزا ریدر و در طول موج ۵۴۰nm خوانده شد. زنده بودن سلولها به صورت درصد سلول‌های دارای فعالیت زیستی نسبت به سلول‌های کنترل منفی، بیان شدند.

کشت سلولی و ترانسفکشن ژن فیرومودلین. سلول‌های سرطانی Huh-7 با دانسیته cells/well ۱×۱۰<sup>۴</sup> در پلیت ۱۲ خانه قرار گرفته و در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪CO<sub>2</sub> به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. ژن فیرومودلین با غلظت بهینه با استفاده از ترکیب لیپوفکتامین به هر چاهک اضافه شد (پلاسمید استفاده شده‌ی ژن فیرومودلین حاوی ژن GFP می‌باشد که خاصیت

پروتئوگلیکان‌های کوچک غنی از لوسئین در ماتریکس خارج سلولی) می‌باشد. فیرومودلین از طریق تعامل با فاکتورهای رشد و رستپورهای مسیرهای پیام‌رسانی در بسیاری از فرآیندهای زیستی و فیزیولوژیکی نظیر تکثیر سلولی و تمایز دخالت می‌نماید و از طریق اتصال به فاکتور رشد مبدل (TGFβ) (EGFR) و القای بیان p21 به گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) و القای بیان p21 به عنوان یک آنتی‌آپوپتوزیز عمل می‌کند [۸،۷]. فیرومودلین به عنوان اصلاح‌کننده‌ی فعالیت TGFβ در بهبود زخم‌ها و تجمع کلاژن در پوست دخالت می‌نماید. هم‌چنین فعالیت آنتاگونیستی برای TGFβ و فعالیت مهارى بر مسیر پیام‌سانی فاکتور هسته‌ای (NFκB) را دارد [۷].

مسیرهای پیام‌رسانی گوناگونی در سلول‌های توموری دست‌خوش تغییر می‌شوند، از جمله TGFβ که یک مسیر پیام‌رسانی درگیر در رشدنمو، هم‌چنین سرکوب تومور از طریق مهار تکثیر و القای آپوپتوز می‌باشد. TGFβ نقش دوگانه‌ای در رشد تومور نیز دارد، زیرا می‌تواند تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری را از طریق مدولاسیون سیستم ایمنی و محیط توموری تحریک نماید [۱۰،۹]. در سرطان کبد، میزان بالایی از TGFβ در سرم بیماران یافت می‌شود که با درمان‌های مؤثر سرطان کبد کاهش می‌یابد. TGFβ یک واسطه‌ی پیام‌رسانی کلیدی در این سرطان به شمار می‌رود که در گذار اپیتلیال به مزانشیمال (EMT)، تهاجم و ارتباط استروما - تومور دخالت می‌نماید [۱۲،۱۱]. فاکتور هسته‌ای (NFκB) مجموعه‌ای از فاکتورهای رونویسی دایمریک و تنظیم‌کننده‌ی اصلی پاسخ ایمنی و التهابی، چسبندگی سلولی، تمایز، تکثیر و آپوپتوز می‌باشد. در حالت طبیعی، دایمر NFκB در سیتوپلاسم سلول از طریق اتصال به مهارکننده‌ی خود به نام IκB غیر فعال است. در حالت فعال‌سازی، IκB فسفریله و تخریب شده و دایمر NFκB آزاد شده و به هسته منتقل می‌شود تا رونویسی از ژن‌های هدف خود را فعال کند [۱۳]. اختلالات التهابی مزمن موجب افزایش بروز انواع مختلفی از سرطان‌ها می‌شود. سلول‌های تومور برنامه‌های التهاب داخل سلولی نظیر مسیر NFκB را فعال می‌نمایند که تاثیر عمیقی بر رشد تومور دارد و با مکانیسم‌های کنترل تکثیر و مرگ سلولی تداخل می‌نماید [۱۶-۱۴]. ارتباط نزدیک میان التهاب و سرطان به ویژه در کبد خود را نشان می‌دهد. زیرا سرطان کبد اغلب با التهاب هپاتیک مزمن ایجاد می‌شود [۱۷].

هدف ما در این تحقیق بررسی اثرات بیان پروتئین فیرومودلین بر مسیرهای پیام‌رسانی NFκB و TGFβ در محیط آزمایشگاهی و در شرایط کشت سلولی بود که در صورت اثربخشی و گذراندن مراحل آزمایشگاهی و حیوانی و در نهایت

فلورسنت دارد) و در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  و  $5\%$   $\text{CO}_2$  به مدت ۴ ساعت با سلول‌ها انکوبه گردید. سپس سلول‌ها با بافر PBS شسته شده و محیط کشت تازه اضافه شد. ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن، جهت تایید ترانسفکشن و تعیین درصد آن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و شمارش سلول‌های سبز رنگ حاوی پلاسمید استفاده گردید.

#### بررسی بیان ژن به روش Syber green Real time

PCR. سلول‌های سرطانی Huh-7 با دانسیته  $1 \times 10^6$  cells/well در پلیت ۶ خانه قرار گرفته و در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  و  $5\%$   $\text{CO}_2$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. ژن فیبرومودلین با غلظت بهینه با استفاده از ترکیب لیپوفکتامین به هر چاهک اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها به منظور استخراج RNA از کیت استخراج RNA شرکت GENE بر اساس پروتکل کیت انجام گرفت استفاده شد. و RNA استخراج شده در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. سپس جهت سنتز cDNA از RNA استخراج شده، از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز- امریکا استفاده گردید. پس از این مراحل cDNA سنتز شده و جهت انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای  $-20^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. با توجه به اهمیت مسیر TGF- $\beta$ - Smad2/3 در روند سرطان‌زایی، میزان بیان این دو ژن، قبل و پس از تیمار با ژن فیبرومودلین مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور، پرایمرهای forward و Reverse مربوط به این دو ژن با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی، توسط شرکت زیست آسیا ثبت سفارش و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی سنتز شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمر ژن های هدف و مرجع

| نام ژن   | پرایمر  | توالی 5'-3'               |
|----------|---------|---------------------------|
| SMAD2/3  | Forward | TGCACCACCAACTGCTTAGC      |
|          | Reverse | GGCATGTCGTCTACGATGTCATGAG |
| TGF-beta | Forward | TGCACGTACGTACCTGCTTAGC    |
|          | Reverse | GGCATGGACGTATTGCTATGAG    |
| GAPDH    | Forward | GGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAAC  |
|          | Reverse | GAGA-GGAAGCGTGTGAGGCGGTAG |

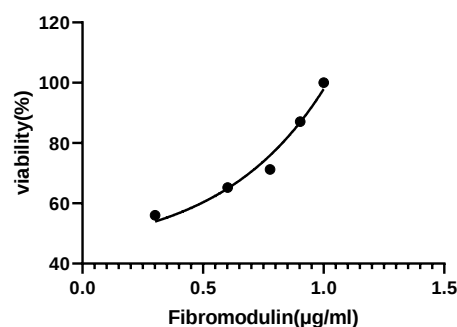
ترانسفکشن ژن فیبرومودلین. ژن فیبرومودلین توسط حامل لیپوفکتامین به داخل سلول هدایت گردید و توسط میکروسکوپ الکترونی درشت نمایی ( $40 \times$ ) ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن بررسی گردید (شکل ۲). همان‌طور که در شکل مشخص است میزان ترانسفکشن سلول‌ها تحت تیمار در مقایسه با گروه سلول کنترل، حدود  $50\%$  می‌باشد (شکل A, B).

#### نتایج

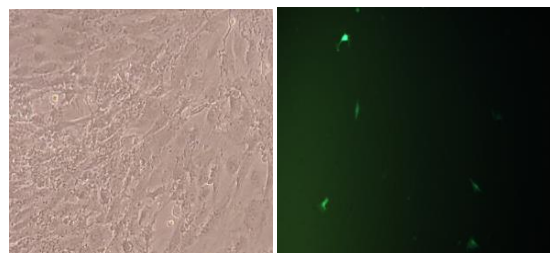
تست MTT. جهت محاسبه‌ی میزان زنده بودن سلول‌ها و تکثیر سلولی در حضور ژن فیبرومودلین، از تست MTT استفاده شد و نتایج حاصل با نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد. تیمار با فیبرومودلین موجب افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها شد، به گونه‌ای که با افزایش غلظت فیبرومودلین میزان تکثیر و رشد سلولی افزایش یافت. فیبرومودلین در غلظت  $10$  میکروگرم موجب شد و زنده بودن سلول‌ها به  $100\%$  برسد (شکل ۱).

فیرومودولین در بیماران مبتلا به سیروز کبدی افزایش می‌یابد. فیرومودولین کبدی، موجب فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبدی (HSCs) و القای فیروز کبدی در موش‌های مبتلا به سیروز مرتبط با هیاتیت C می‌شود [۱۹]. اگرچه فیرومودولین به عنوان یک آنتی‌ژن جدید مرتبط با تومور در بدخیمی‌هایی مانند لنفوم، لوسمی و لیومیوما در نظر گرفته شده است [۱۸]، اما نقش آن در ایجاد سرطان کبد هنوز به خوبی روشن نشده است [۲۰].

در مطالعه‌ی حاضر، تاثیر فیرومودولین بر بیان ژن‌های TGF- $\beta$  و SMAD2/3 در ردهی سلولی سرطان کبد انسانی Huh-7 بررسی شد. نتایج نشان داد فیرومودولین موجب تنظیم کاهشی این ژن‌ها در سلول‌های ترانسفکت شده با ژن فیرومودولین در مقایسه با سلول‌های کنترل گردید. همچنین نتایج MTT نشان داد که تیمار با فیرومودولین موجب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های Huh-7 به طریق وابسته به دوز می‌شود. مسیرهای پیام‌رسانی نقش بسیار مهمی در تنظیم اعمال سلولی برعهده دارند و هر گونه اختلال در ژن‌های درگیر در این مسیرها با بروز بیماری‌های گوناگون ارتباط دارد. از جمله‌ی این مسیرها می‌توان به مسیر TGF- $\beta$  اشاره نمود که نقش آن در بروز سرطان‌های گوناگون به خوبی روشن شده است. در سرطان کبد، TGF $\beta$  با متوقف کردن تکثیر سلولی در ابتدای فاز G1 چرخه‌ی سلولی و القای آپوپتوز، روند سرطان را مهار می‌کند. از طرف دیگر، موجب پیشروی EMT، بقا و تمایز فیروبیلاست‌های مرتبط با سرطان می‌شود که تهاجم و متاستاز سرطان کبد را به دنبال دارد [۲۱]. به عبارت دیگر، TGF $\beta$  ابتدا به صورت یک سرکوب‌گر توموری عمل می‌نماید و سپس با پیشروی تومور و تغییر در پاسخ سلول‌های توموری به آن، به عنوان یک محرک قوی برای حرکت و تهاجم و حفظ سلول‌های بنیادی تومور نقش ایفا می‌کند [۲۲]. نمونه‌ی دیگری از مسیرهای درگیر در سرطان کبد، مسیر NF $\kappa$ B است که نقشی حیاتی در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی التهابی در کبد بازی می‌کند. NF $\kappa$ B در بیماری‌های مزمن کبدی مانند بیماری کبد الکلی، کبد چرب غیر الکلی و هیاتیت ویروسی فعال می‌شود، در حالی‌که غیرفعال شدن ژنتیکی آن با آسیب خودبه‌خودی و فیروز کبدی مرتبط است. تمامی این رویدادها در بروز و پیشروی سرطان کبد دخیلند [۲۳]. مطالعه‌ای نشان داد که بیان فیرومودولین در فیروبیلاست‌ها به طور قوی موجب سرکوب فعالیت NF- $\kappa$ B از طریق ممانعت و کند کردن تخریب I $\kappa$ B. این مکانیسم به ۳ طریق انجام شد: فعال کردن c-Jun N-terminal kinase، مهار فعالیت کالپنین و کازئین کیناز ۲ و القای آپوپتوز فیروبیلاست [۲۴]. پروتئین‌های فیرومودولین و

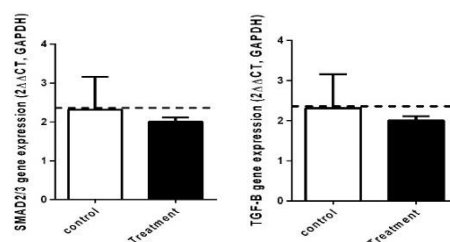


شکل ۱. داده‌های آزمون MTT



شکل ۲. سلول‌های Huh-7 ترانسفکت شده با وکتور فیرومودولین. A تصویر گروه کنترل سلول Huh-7، B تصویر گروه سلول‌های Huh-7 تحت تیمار با وکتور

روش Real Time PCR جهت بررسی سطح بیان ژن‌های SMAD2/3، TGF-B. به منظور بررسی اثر فیرومودولین بر روی مسیر TGF- $\beta$ ، میزان بیان دو ژن SMAD2/3 و TGF- $\beta$  در سلول‌های تیمار شده با فیرومودولین و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) با استفاده از Real-Time PCR اندازه‌گیری و مقایسه شد. نتایج نشان داد که بیان این ژن‌ها در گروه تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل به میزان قابل توجه ۱/۵ برابر کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی بیان دو ژن SMAD2/3 و TGF-B در گروه‌های تحت تیمار با فیرومودولین و کنترل

## بحث و نتیجه‌گیری

فیرومودولین نوعی پروتئوگلیکان کراتان سولفات متعلق به خانواده‌ی پروتئوگلیکان‌های کوچک غنی از لوسئین در ماتریکس خارج سلولی (ECM) است که در تنظیم فیبریلونریز کلاژن، آپوپتوز، مهاجرت سلولی، تنظیم فعالیت TGF $\beta$ ، مکانیسم‌های التهابی و رگ‌زایی نقش دارد [۱۸]. بیان

- [4] Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2019; 156: 477-491.
- [5] Endeshaw M, Hallowell BD, Razzaghi H, Senkomago V, McKenna MT, Saraiya M. Trends in liver cancer mortality in the United States: Dual burden among foreign-and US-born persons. *Cancer*. 2019;125(5):726-34.
- [6] Scheller EL, Krebsbach PH. Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration. *J Dent Res* 2009; 88: 585-596.
- [7] Dawoodi Nejad L, Biglari A, Annese T, Ribatti D. Recombinant fibromodulin and decorin effects on NF- $\kappa$ B and TGF $\beta$ 1 in the 4T1 breast cancer cell line. *Oncol Lett* 2017; 13: 4475-4480.
- [8] Baghy K, Tátrai P, Regös E, Kovalszky I. Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 379.
- [9] Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 1999; 10: 303-360.
- [10] Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 137823.
- [11] Neuzillet C, de Gramont A, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. Perspectives of TGF- $\beta$  inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 2014; 5: 78.
- [12] Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cell Signal* 2011; 23: 951-962.
- [13] Gao J, Xu HL, Gao S, Zhang W, Tan YT, Rothman N, et al. Genetic polymorphism of NFKB1 and NFKBIA genes and liver cancer risk: a nested case-control study in Shanghai, China. *BMJ Open* 2014; 4: e004427.
- [14] Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 823-830.
- [15] Park MH, Hong JT. Roles of NF- $\kappa$ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* 2016; 5.
- [16] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a001651.
- [17] Mossanen JC, Tacke F. Role of lymphocytes in liver cancer. *Oncoimmunology* 2013; 2: e26468.
- [18] Pourhanifteh MH, Mohammadi R, Noruzi S, Hosseini SA, Fanoudi S, Mohamadi Y, et al. The role of fibromodulin in cancer pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Cancer Cell Int* 2019; 19: 157.
- [19] Mormone E, Lu Y, Ge X, Fiel MI, Nieto N. Fibromodulin, an oxidative stress-sensitive proteoglycan, regulates the fibrogenic response to liver injury in mice. *Gastroenterology* 2012; 142: 612-621.e5.
- [20] Baghy K, Tátrai P, Regös E, Kovalszky I. Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 379-393.
- [21] Morén A, Bellomo C, Tsubakihara Y, Kardassis D, Mikulits W, Heldin CH, Moustakas A. LXR $\alpha$  limits TGF $\beta$ -dependent hepatocellular carcinoma associated fibroblast differentiation. *Oncogenesis* 2019; 8: 36.
- [22] Jia M, Souchelnytskyi S. Comments on the cross-talk of TGF $\beta$  and EGF in cancer. *Exp Oncol* 2011; 33: 170-173.
- [23] Luedde T, Schwabe RF. NF- $\kappa$ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 108-118.
- [24] Lee YH, Schiemann WP. Fibromodulin suppresses nuclear factor- $\kappa$ B activity by inducing the delayed degradation of IKBA via a JNK-dependent pathway coupled to fibroblast apoptosis. *J Biol Chem* 2011; 286: 6414-6422.
- [25] Jazi MF, Biglari A, Mazloomzadeh S, Kingston P, Ramazani A, Bazzaz JT, Eskandari M. Recombinant fibromodulin has therapeutic effects on diabetic nephropathy by down-regulating transforming growth factor- $\beta$ 1 in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19: 265-271.

دکورین (یکی دیگر از انواع پروتئین‌های خانوادگی SLRP) موجب تنظیم کاهشی NF- $\kappa$ B و TGF- $\beta$  در رده سلولی سرطان سینه T14 گردید و تاثیر فیبرومودولین در این زمینه قوی‌تر از دکورین بود [۷]. در مطالعه دیگری، تاثیر فیبرومودولین بر نفروپاتی دیابتیک بررسی شد. فیبرومودولین موجب تنظیم کاهشی TGF- $\beta$  در رت‌هایی شد که با القای استرپتوزوتوسین دیابتی شده بودند. TGF $\beta$  با توسعه فیروز و اسکروز گلوامولی در نفروپاتی دیابتیک مرتبط بود [۲۵]. هم‌راستا با نتایج مطالعات پیشین، مطالعه حاضر نشان داد فیبرومودولین به طور معناداری میزان بیان ژن‌های مسیر TGF $\beta$  و NF $\kappa$ B را در سلول‌های سرطان کبد کاهش داد. همچنین تیمار رده سلولی سرطان کبد با فیبرومودولین سبب افزایش رشد سلول‌ها گردید. به نظر می‌رسد ژن فیبرومودولین دارای اثرات ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطان کبد است و می‌تواند در مباحث ژن درمانی در مدل‌های حیوانی و انسانی سرطان کبد مورد بررسی قرار گیرد تا در ترکیب با درمان‌های دیگر موجب بهبود نتایج درمانی و افزایش شانس بقا در بیماران شود.

این مطالعه بر روی رده سلولی سرطان کبد انجام شد. به منظور دستیابی به نتایج معتبرتر، بهتر است تاثیر این پروتئین در شرایط *In vivo* با مدل‌های حیوانی بررسی شود. همچنین بایستی به تاثیر فیبرومودولین بر سایر مسیرهای پیام‌رسانی حیاتی درگیر در پروسه‌های زیستی و بیماری‌زا نیز پرداخته شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک بود. لذا از کلیه همکاران بخش‌های پژوهشی دانشگاه جهت حمایت مالی طرح صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

## منابع

- [1] Petrick JL, McGlynn KA. The changing epidemiology of primary liver cancer. *Curr Epidemiol Rep* 2019; 6: 104-111.
- [2] Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlander N, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* 2018; 124: 2785-2800.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 7-34.

## Effects of fibromodulin protein expression on NFκB and TGFβ signaling pathways in liver cancer cells

Sara Sadat Khatami (M.Sc)<sup>1</sup>, Fatemeh Tavakoli (M.Sc)<sup>2</sup>, Hossein Bagheri (M.Sc)<sup>1</sup>, Reza Salarinia (Ph.D)<sup>3</sup>, Amirreza Hesari (M.Sc)<sup>1</sup>, Faezeh Ghasemi (Ph.D)<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> – Dept. of Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>2</sup> – Dept. of Biotechnology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> – Dept. of Medical Biotechnology and Molecular Sciences, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

\* Corresponding author. +98 21 88601501 ghasemi\_808@yahoo.com

Received: 14 Aug 2019; Accepted: 27 Nov 2019

**Introduction:** The incidence rate of liver cancer is continuously increasing. Currently, gene therapy is applied to improve various medical issues such as cancer treatment approaches. Correspondingly, fibromodulin involves in many biological and physiological processes through interaction with growth factors and signaling pathway receptors. The aim of this study was to investigate the effects of fibromodulin gene expression on NF-κB and TGF-β signaling pathways in liver cancer cells in order to investigate the molecular pathway genes involved in this cancer.

**Materials and Methods:** Huh-7 human liver cancer cells were cultured and the effect of fibromodulin on cell growth and proliferation was assessed using MTT assay. Then, fibromodulin gene was transfected into cells using lipofectamine and the expression of SMAD2 / 3 and TGF-β genes were investigated by Real-Time PCR method.

**Results:** The effect of fibromodulin on TGF-β and SMAD 2/3 expression genes was evaluated in liver cancer cell line. Fibromodulin down-regulated the TGF-β and NF-κB pathways in transfected cells, compared to the control. Also, MTT results demonstrated that treatment with fibromodulin increased growth and proliferation of Huh-7 cell line in a dose-dependent manner.

**Conclusion:** According to the results of the study, fibromodulin significantly decreased the expression levels of TGF/β and NF/κB pathway genes in liver cancer cell line. Furthermore, growth and proliferation of liver cancer cells were increased after treatment with fibromodulin. It seems that fibromodulin gene has anticancer effects on liver cancer cells.

**Keywords:** Liver Neoplasms, Fibromodulin, Signaling Pathway, NF-kappa B, Transforming Growth Factor beta.