تحقیقی

میزان بیان پلی‌مورفیسم D299G و T399I ژن *TLR4* در رده سلولی سرطان کولورکتال به روش فلوسایتومتری

دکتر هما داودی*[۱]، دکتر سیدرضا هاشمی[۲]، دکتر هنگ فنگ سیااو[۳]

۱- دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان. ۲- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳- استاد گروه آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه یو پی ام مالزی.

چکیده

زمینه و هدف : *گیرنده‌های شبه Toll (TLRs) به عنوان مهم‌ترین گیرنده‌ها در ایمنی ذاتی شناخته شده‌اند. گیرنده TLR4 به عنوان گیرنده اصلی در شناسایی لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتری‌های گرم منفی عمل می‌کند. دو پلی‌مورفیسم D299G (SNP rs4986790) و T399I (SNP rs4986791) در ژن این گیرنده موجب کاهش پاسخ‌دهی به LPS می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین میزان بیان پلی‌مورفیسم‌های مختلف ژن TLR4 در رده سلولی سرطان کولورکتال HT29 ، HCT116 و CaCo2 به روش فلوسایتومتری انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه آزمایشگاهی انتقال پلاسمید حاوی ژن واریته‌های مختلف شامل Flag-tagged-TLR4 وحشی، Flag-tagged D299G و Flag-tagged T399I موتان به سلول‌های HCT116 توسط معرف Turbofect صورت گرفت. راندمان انتقال ژن توسط پلاسمید GFP ارزیابی شد. میزان بیان واریته‌های مختلف TLR4 در سلول‌های دریافت کننده ژن‌ها از طریق فلوسایتومتری بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-11.5 و آزمون Chi-Square تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *رده‌های سلولی HT29 وCaCo2 گیرنده TLR4 را در سطح پایینی بیان کردند. در حالی که سلول‌های HCT116 قبل از انتقال پلاسمید، ژن TLR4 را در سطح قابل ردیابی به روش فلوسایتومتری بیان نکردند. راندمان انتقال ژن GFP به داخل سلول‌های HCT116 به‌وسیله آنالیز میکروسکوپی و فلوسایتومتری حدود ۸۰ درصد اندازه‌گیری شد. براین اساس میزان بیان TLR4 و پاسخ‌دهی به LPS در سلول‌هایی که ژن واریته وحشی TLR4 را دریافت کردند؛ به‌طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌هایی بود که ژن واریته موتان را دریافت کردند (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *سطح پایین بیان TLR4 روی سلول‌های دارای نوع موتان گیرنده نشان داد که این پلی‌مورفیسم‌ها روی بیان گیرنده در سلول‌های سرطان کولون اثر دارند.*

کلید واژه‌ها : *ژن TLR4 ، پلی‌مورفیسم ، LPS ، رده سلولی HCT116*

* نویسنده مسؤول : دکتر هما داودی ، پست الکترونیکی homdavoodi@yahoo.com
نشانی : گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، تلفن و نمابر ۰۱۷۱-۴۴۴۰۲۲۵
وصول مقاله : ۹۱/۱/۱۵ ، اصلاح نهایی : ۹۱/۶/۲۵ ، پذیرش مقاله : ۹۱/۸/۲۱

مقدمه

گیرنده‌های شبه Toll (*TLRs*) اولین بار به عنوان گیرنده اصلی موثر در تکامل جنین مگس سرکه شناخته شدند. در سال ۱۹۹۶ نشان داده شد که این گیرنده‌ها در مگس سرکه در پاسخ‌های ایمنی علیه قارچ‌ها موثرند (۱). از آن زمان نقش این گیرنده‌ها در ایمنی ذاتی به‌طور جدی نه تنها در حشرات بلکه در پستانداران مطالعه شد. در حال حاضر این خانواده شامل ۱۰ عضو در انسان و ۱۲ عضو در موش است (۲). این گیرنده‌ها توزیع متفاوتی در سلول‌ها دارند(۳). از این خانواده *TLR1*، *TLR2*، *TLR4* و *TLR6* در سطح سلول بیان می‌شوند. در حالی که *TLR3*، *TLR7*، *TLR8* و *TLR9* در ساختار داخل سلولی یافت شده‌اند (۴). یکی از شناخته شده‌ترین این گیرنده‌ها *TLR4* است که به عنوان گیرنده اصلی در شناسایی لیپوپلی‌ساکارید (LPS) باکتری‌های گرم منفی عمل می‌کند (۵). ژن *TLR4* بر روی کروموزوم شماره ۹ قرار دارد. این ژن دارای ۱۱۰۱۳ جفت باز، سه اگزون و دو اینترون است. پروتئین تولید شده توسط این ژن شامل ۸۴۲ اسیدآمینه است (۶). ژن *TLR4* بسیار پلی‌مورفیک است. مطالعات زیادی روی دو پلی‌مورفیسم *TLR4* در اگزون شماره ۳ این ژن انجام شده است (۹-۷). این پلی‌مورفیسم‌ها شامل

جابجایی باز گوانین با آدنین (SNP rs4986790) است که موجب جابجایی اسیدآمینه گلایسین به جای آسپارتیک اسید در اسیدآمینه شماره ۲۹۹ (D299G) می‌شود. همچنین جابجایی تیمین با سیتوزین (SNP rs4986791) که موجب جابجایی اسیدآمینه ایزولوسین با ترئونین در اسیدآمینه شماره ۳۹۹ (T399I) می شود(۱۰). این پلی‌مورفیسم‌ها در بخش خارجی *TLR4* واقع شده و با تغییر در قدرت اتصال این گیرنده به لیگاند باعث اختلال در سیگنال‌های فرستاده شده از طریق گیرنده *TLR4* می‌شوند. گزارش شده است این پلی‌مورفیسم‌ها (D299G , T399I) باعث کاهش پاسخ‌دهی *TLR4* به LPS استنشاقی می‌شوند. به‌طوری که وارد کردن ژن وحشی *TLR4* به سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی یا ماکروفاژهای ریه در افراد دارای *TLR4* موتان باعث برطرف شدن این اختلال می‌گردد (۱۱). از آنجا که موتاسیون در نواحی خارج سلولی *TLR4* ممکن است بر بیان و یا نحوه انتقال این گیرنده به سطح سلول موثر باشد؛ نقص در پاسخ‌دهی افراد دارای *TLR4* موتان ممکن است به خاطر کاهش بیان این گیرنده‌ها بر روی سطح سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی باشد. مطالعه افراد دارای پلی‌مورفیسم‌های ژن کدکننده *TLR4* می‌تواند ارتباط بین این پلی‌مورفیسم‌ها و بیماری‌های انسان را نشان دهد (۱۲و۱۳). در مطالعات متعددی همراهی این پلی‌مورفیسم‌ها با بیماری‌های عفونی و سرطان‌ها گزارش شده است. تقابل بیماری‌های عفونی با التهاب مزمن احتمالاً سبب افزایش خطر سرطان می‌شود. سرطان کولون به عنوان دومین سرطان منجر به مرگ در کشورهای توسعه یافته است (۱۴). اخیراً مطالعات ژنتیک ارتباط بیماری‌های التهابی مزمن از جمله بیماری التهابی روده (IBD) را با سرطان نشان داده است. سلول‌های اپیتلیال روده توانایی بیان چندین نوع *TLR* از جمله *TLR2*، *TLR4*، *TLR5* و *TLR9* را دارند (۱۵و۱۶). TLR2 با لیگاند لیپوپروتین، *TLR4* با لیپوپلی‌ساکارید، *TLR5* با فلاژلین و *TLR9* با cpGDNA باند می‌شود. شواهد آزمایشگاهی نشان‌دهنده ارتباط بین انتقال پیام توسط *TLRs* و روند گسترش سلول‌های توموری در بدن است. سلول‌های اپیتلیال روده به عنوان اولین سد دفاعی سیستم ایمنی مخاطی باید بتواند بین ارگانیسم‌های پاتوژن و غیرپاتوژن تمایز قائل شده و پاسخ مناسبی به این باکتری‌ها بدهد تا با ایجاد هموستازی در لومن روده از پاسخ‌های التهابی جلوگیری کند و از طرف دیگر پاسخ ایمنی مناسب در مواجه با پاتوژن‌ها ارائه دهد. اگرچه پاسخ ایمنی ذاتی در کنترل عفونت ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌های پاتوژن مهم است؛ اما پاسخ التهابی کنترل نشده و تولید سایتوکاین‌ها بدون تنظیم مناسب می‌تواند برای میزبان خطرناک باشد (۱۷). نقش گیرنده‌های *TLR* به‌خصوص *TLR4* در ایجاد و ابقاء هموستازیس در لومن روده در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۱۰-۸). پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن این گیرنده می‌تواند برمیزان بیان، انتقال پیام و القاء همو ستازیس در لومن روده اثرگذار باشد.هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر پلی‌مورفیسم‌های ژن *TLR4* بر بیان واریته‌های مختلف آن در سلول‌های سرطانی کولورکتال (HCT116) و میزان پاسخ‌دهی آنها به LPS با استفاده از روش فلوسایتومتری بود.

روش بررسی

بررسی میزان بیان TLR4 روی رده‌های سلولی سرطان کولون

در این مطالعه آزمایشگاهی برای بررسی اثر پلی‌مورفیسم‌های ژن *TLR4* بر بیان واریته‌های مختلف آن، چند رده سلولی سرطان کولورکتال انتخاب شد. رده‌های سلولی استفاده شده شامل HT29، HCT116 و CaCo2 بود. از آنجا که میزان بیان واریته‌های موتان در سلول‌هایی بررسی می‌شوند که ژن این موتاسیون‌ها را از طریق پلاسمید (Transfected cells) دریافت کرده‌اند؛ رده سلولی انتخاب شد که قبل از انتقال پلاسمید نتواند گیرنده *TLR4* را روی سطح خود بیان کند تا در بیان ژن موتان انتقال یافته به داخل سلول تداخل نکند. رده‌های سلولی ذکر شده از ATCC (American Type Culture Colection) خریداری شد و تمام مواد و معرف‌های استفاده شده در کشت سلولی از شرکت اینویتروژن (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) تهیه شدند. برای بررسی میزان بیان گیرنده *TLR4* در این سلول‌ها از روش فلوسایتومتری استفاده شد. در این مرحله رده سلولی مناسب برای انتقال ژن *TLR4* موتان و وحشی انتخاب شد. سپس این سلول‌ها با پلاسمید حاوی ژن‌های موردنظر و معرف Turbofect از شرکت Fermentas برای انتقال ژن مجاور شدند. پلاسمید Flag-CMV1-*TLR4* حاوی ژن‌های وحشی و موتان *TLR4* توسط دکتر Stefanie و دکتر Prasad از دانشگاه مریلند به عنوان هدیه در اختیار ما قرار گرفت.

کشت سلولی و آماده‌سازی سلول‌ها برای پذیرش ژن پلاسمید

رده سلولی HCT116 (ATCC CCL 247) برای دریافت پلاسمید حاوی ژن خارجی انتخاب شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI با سرم ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک ۰/۶ درصد (Pen-Strep) در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پاساژهای اولیه از این سلول‌ها با غلظت ۳×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک به مدت ۲۴ ساعت قبل از انتقال ژن در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند.

انتقال پلاسمید به سلول

انتقال پلاسمید به سلول‌ها توسط معرف Turbofect که یک پلیمر کاتیونیک است؛ انجام شد. تراکم سلول‌ها در زمان انتقال ژن ۸۰-۶۰ درصد در نظر گرفته شد. پلاسمیدهای انتقال‌یافته به‌طور

مجزا شامل *TLR4*-Flag-tagged وحشی، flag-tagged D299G و flag-tagged T399I و GFP (Pmax GFP) به عنوان کنترل بود.

مقدار ۱/۵ میکروگرم از DNA پلاسمید در ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI فاقد سرم رقیق شد. مقدار۶ میکرولیتر از معرف Turbofect به DNA پلاسمید رقیق شده اضافه شد و ترکیب حاصله به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از ترکیب DNA پلاسمید و معرف Turbofect به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و در انکوباتور CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بیان ژن‌های انتقال یافته ۴۸ ساعت بعد بررسی شدند. در این آزمایش‌ها کنترل مثبت شامل پلاسمید GFP و کنترل منفی شامل معرف Turbofect به تنهایی بود. راندمان انتقال ژن با استفاده از پلاسمید حاوی ژن GFP (Pmax GFP) به روش میکروسکوپی و فلوسایتومتری بررسی شد. پس از ۴۸ ساعت از زمان انتقال پلاسمیدها، سلول‌ها با LPS اشریشیا کلی (B4: 0111, Sigma, L2630) به میزان یک میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۶۰ دقیقه تحریک شدند. سپس سلول‌ها جمع‌آوری شده و برای بررسی میزان بیان *TLR4* در نمونه‌های وحشی و موتان مورد استفاده قرار گرفتند.

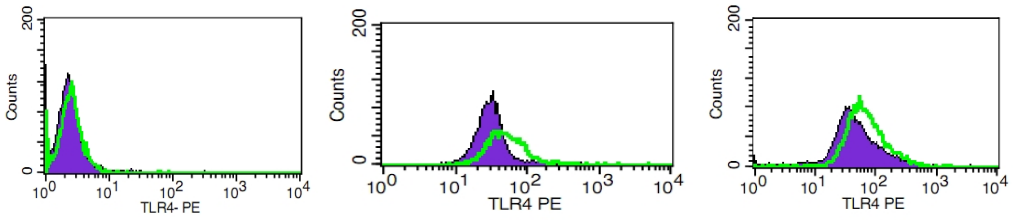
بررسی راندمان انتقال ژن

الف) آنالیز میکروسکوپی

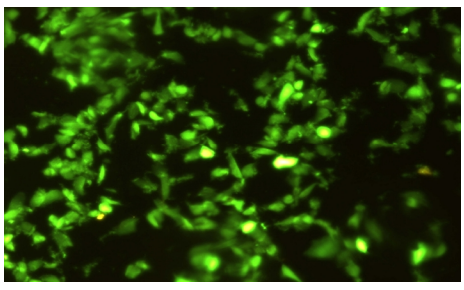
برای بررسی راندمان انتقال ژن به سلول از پلاسمید Pmax GFP استفاده شد. سلول‌ها به همان روشی که در بالا ذکر شد؛ کشت داده شدند. در هر یک از چاهک‌ها یک لامل استریل قرار داده شد و سلول‌ها روی لامل کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت از زمان انتقال ژن لامل‌ها با یک پنس برداشته شده و به‌صورت وارونه روی لام قرار گرفتند. سلول‌ها از نظر بیان ژن GFP با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. درصد سلول‌هایی که زیر میکروسکوپ فلورسنت سبز داشتند؛ به عنوان راندمان انتقال ژن به سلول در نظر گرفته شد.

ب) آنالیز فلوسایتومتری

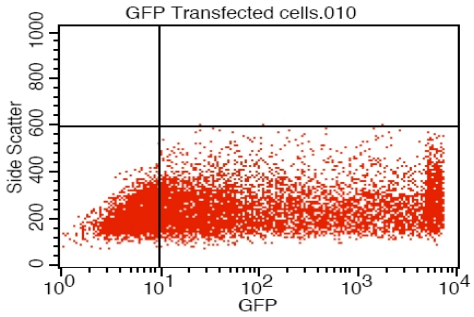
سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند. سپس با پلاسمید Pmax GFP و معرف Turbofect مجاور شدند. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها در ۴۰۰ میکرولیتر PBS/BSA جمع‌آوری شده و درصد سلول‌های بیان کننده فلورسنت سبز به‌وسیله فلوسایتومتری بررسی گردید.



شکل ۱ : آنالیز فلوسایتومتری بیان TLR4 روی سلول‌های سرطان کولورکتال
گیرنده TLR4 روی سلول‌های HT29 و CaCo2 در سطح پایین بیان شد؛ اما روی سلول‌های HCT116 رد یابی نگردید.

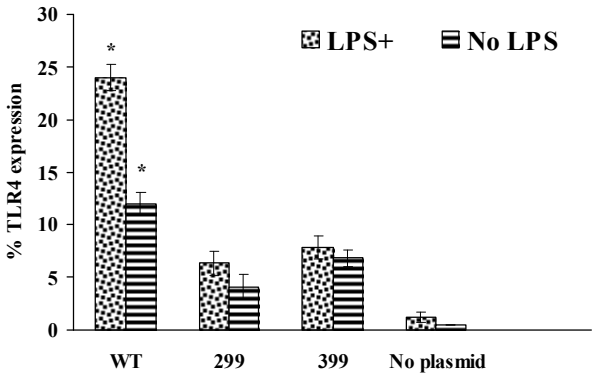


آنالیز میکروسکوپی



فلوسایتومتری

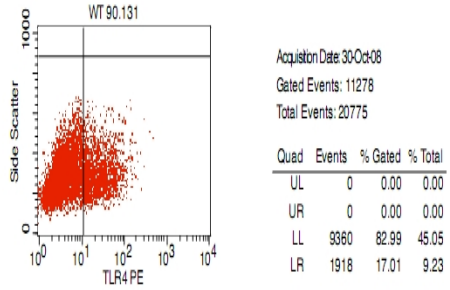
شکل ۲ : بیان پروتئین GFP ۲٤ ساعت پس از انتقال ژن به سلول‌های HCT116
با یک میکروگرم پلاسمیدPmax GFP و ۲ میکرولیتر معرف Turbofect
بررسی راندمان انتقال ژن به وسیله آنالیز میکروسکوپی و فلوسایتومتری نشان داد که حدود ۸۰ درصد سلول‌ها ژن GFP را دریافت کرده‌اند.



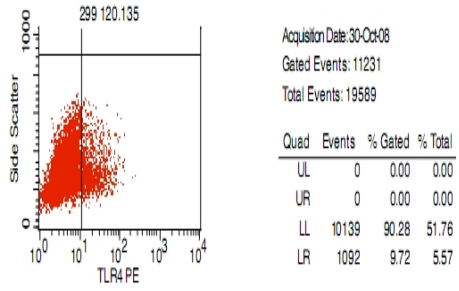
شکل ۳ : آنالیز فلوسایتومتری بیان TLR4 روی سلول‌های HCT116 ۴۸ ساعت پس از دریافت پلاسمید حاوی ژن‌های مختلف TLR4 و مجاورت با LPS به مقدار یک میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت یک ساعت.

داده‌ها به صورت میانگین± انحراف استاندارد در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ بیان شده است. همه انواع سلول‌ها بیان گیرنده را در پاسخ به LPS افزایش دادند؛ اما میزان این افزایش تنها در سلول‌های دریافت کننده ژن وحشی معنی‌دار بود.

WT سلول دریافت کننده ژن نوع وحشی، ۲۹۹ سلول دریافت کننده ژن نوع موتان D299G، ۳۹۹ سلول دریافت کننده ژن موتان نوعT399I



نوع وحشی (WT)



نوع موتان (۲۹۹)

شکل ٤ : آنالیز فلوسایتومتری بیان TLR4 در سلول‌هایی که پلاسمید حاوی ژن واریته وحشی و موتان به آنها منتقل شده است. میزان بیان در سلولی که نوع وحشی را دریافت کرده؛ تقریباً دو برابر سلولی است که ژن نوع موتان را دریافت کرده است.

ج) رنگ‌آمیزی سلول‌های بیان کننده TLR4 با آنتی‌بادی اختصاصی

پس از ۴۸ ساعت از زمان انتقال ژن به سلول ، سلول‌ها تریپسینه شده و در نهایت یک سوسپانسیون سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر PBS تهیه شد. مقدار یک میکروگرم آنتی‌بادی ضد TLR4 (BD Biosciences) به سلول‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شدند. پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه، سلول‌ها با یک میلی‌لیتر PBS شسته شدند و برای ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و مراحل ذکر شده برای آنتی‌بادی ثانویه (BD Biosciences, mouse PE-conjugated anti human IgG) تکرار شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-11.5 و آزمون Chi-Square تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آزمایش‌های فلوسایتومتری نشان داد که بیان ژن *TLR4* در سلول‌های HCT116 در سطح پایینی است. به‌طوری که قابل ردیابی به روش فلوسایتومتری نبود. در حالی که سلول‌های HT29 و CaCo2 به میزان کم *TLR4* را بیان کردند (شکل یک).

بررسی راندمان انتقال ژن به‌وسیله آنالیز میکروسکوپی و فلوسایتومتری در سلولهای HCT116 نشان داد که حدود ۸۰ درصد سلول‌ها ژن GFP را دریافت کرده‌اند (شکل ۲).

بیان *TLR4* روی سلول‌های HCT116 و پاسخ‌دهی این سلول‌ها به LPS پس از ۴۸ ساعت انتقال ژن به سلول‌ها با روش فلوسایتومتری در شکل ۳ نشان داده شده است. سلول‌هایی که ژن واریته وحشی را دریافت کرده بودند؛ با میانگین بیان ۲۴درصد با انحراف معیار حدود ۱/۱۸ در مقایسه با انواع موتان (۶ و ۷ درصد) و همین‌طور سلول‌هایی که ژن دریافت نکرده بودند (۱/۵ درصد) به‌صورت معنی‌داری میزان بیان بیشتری نشان دادند (P<۰/۰۵).

در پاسخ به LPS در همه سلول‌ها بیان گیرنده افزایش یافت؛ اما این افزایش در سلول‌هایی که ژن واریته وحشی *TLR4* را دریافت کرده بودند؛ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) و در سلول‌هایی که ژن‌های واریته موتان را دریافت کرده بودند و نیز در گروه کنترل معنی‌دار نبود. بیشترین سطح بیان *TLR4* پس از ۶۰ دقیقه تیمار با LPS در سلول‌های دارای نوع وحشی ردیابی گردید. میزان بیان این گیرنده در دو نوع سلول موتان تفاوت آماری معنی‌داری نداشت؛ اما تفاوت این سلول‌ها با سلول‌های کنترل از نظر بیان *TLR4* معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

نتیجه یکی از آزمایش‌های فلوسایتومتری *TLR4* در سلول‌هایی که ژن‌های واریته نوع وحشی و موتان D299G را دریافت کردند در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان بیان در سلولی که نوع وحشی را دریافت کرده؛ تقریباً دو برابر سلولی است که ژن نوع موتان را دریافت کرده است.

بحث

گیرنده‌های *TLRs* دائماً بر سطح سلول‌هایی که احتمالاً اولین سد برخورد با آنتی‌ژن هستند؛ بیان می‌شوند. سلول‌های فاگوسیت کننده مانند ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های دندریتیک مهم‌ترین مخازن این گیرنده‌ها بوده و مقادیر بالایی از این گیرنده‌ها را بیان می‌کنند (۱۸). اخیراً گزارش شده که بیان این گیرنده‌ها تنها به سلول‌های ایمنی محدود نشده و قسمت اعظم سلول‌های بدن می‌توانند حداقل یک گروه از *TLRs* را بیان کنند (۱۹). نتایج مطالعه حاضر با فلوسایتومتری نشان داد که *TLR4* روی سلول‌های HCT116 بیان نمی‌شود و روی سلول‌های HT29 و CaCo2 در سطح بسیار پایین بیان می‌شود. سطح پایین بیان *TLR4* روی این سلول‌ها به عنوان سلول‌های اپیتلیال روده نشان‌دهنده تولرانسی است که طی مراحل تکامل، سلول‌های اپیتلیال روده به باکتری‌های گرم منفی ساکن روده نشان داده‌اند. این موضوع احتمالاً یکی از مکانیسم‌هایی است که موجب تولرانس به اندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی روده می‌شود (۱۷). در مطالعه Suzuki و همکاران سلول‌های اپیتلیال روده انسان براساس بیان *TLR4* به سه دسته سلول‌های با بیان کم مثل HCT116 ، سلول‌هایی که *TLR4* را روی سطح سلول در حد ردیابی (SW480) بیان می‌کنند و سلول‌هایی که *TLR4* را به‌صورت سیتوپلاسمی (Colo205) بیان می‌کنند؛ تقسیم گردید (۲۰). در مطالعه ما هم بیان *TLR4* روی سلول‌های HCT116 بدون پلاسمید و بدون تحریک با LPS قابل ردیابی با روش فلوسایتومتری نبود. به‌همین خاطر این سلول برای بیان ژن‌های وحشی و موتان *TLR4* انتخاب شد تا بیان ژن اصلی سلول در بیان ژن انتقال یافته به سلول مداخله نکند. در مطالعه An و همکاران پاسخ سلول‌های دندرتیک به تحریک با LPS باعث افزایش بیان *TLR4* گردید (۲۱). در مقابل He و همکاران نشان دادند که سلول‌های سرطانی ریه انسان تحت تاثیر تحریک با LPS قرار نگرفته و سطح بیان *TLR4* در جواب به LPS تغییر معنی‌داری نداشت (۱۶). این مطالعات نشان می‌دهد که پاسخ به LPS در سلول‌های مختلف براساس نوع و عملکرد بافت متفاوت است.

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پلی‌مورفیسم‌های *TLR4* بر میزان بیان این گیرنده و پاسخ‌دهی به LPS بود. در این مطالعه سلول‌های HCT116 که پلاسمید حاوی ژن‌های مختلف *TLR4* را دریافت کرده بودند؛ این گیرنده را روی سطح خود بیان کردند. میزان بیان نوع وحشی گیرنده به‌طور معنی‌داری بیشتر از نوع موتان بود و انواع وحشی در پاسخ به LPS به‌طور معنی‌دار بیان گیرنده را افزایش دادند. بیان نوع وحشی *TLR4* روی سلول‌های HCT116 بعد از انتقال پلاسمید و تحریک با LPS ، در شرایط بهینه کمتر از ۳۰درصد بود و برای انواع موتان تقریباً نصف این مقدار بود.

مکانیسم کاهش پاسخ‌دهی به LPS در سلولی که ژن موتان *TLR4* را دریافت کرده مشخص نیست؛ اما براساس مطالعه Arbour و همکاران انواع موتان *TLR4* ممکن است؛ در بیان ملکول پروتئین بر سطح سلول دچار مشکل باشند. همچنین این پلی‌مورفیسم‌ها باعث کاهش پاسخ‌دهی به LPS استنشاقی می‌شوند. به‌طوری که وارد کردن ژن وحشی *TLR4* به سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی یا ماکروفاژهای ریه در افراد دارای *TLR4* موتان باعث برطرف شدن این اختلال می‌شود (۱۱). در مطالعه ما نیز حساسیت گیرنده‌های موتان به تحریک با LPS نسبت به نوع وحشی کاهش آماری معنی‌داری نشان داد. حال این که کاهش حساسیت موتان‌های *TLR4* به LPS باکتری‌های گرم منفی وکاهش بیان انواع موتان نسبت به وحشی چه تاثیرات احتمالی روی استعداد افراد به ابتلاء به بیماری‌های عفونی، التهاب‌های مزمن و سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولورکتال دارد؛ نیاز به پژوهش‌های بیشتری در این زمینه دارد.

نتیجه‌گیری

سطح پایین بیان *TLR4* روی سلول های دارای نوع موتان گیرنده نشان داد که این پلی‌مورفیسم‌ها روی بیان گیرنده در سلول‌های سرطان کولون اثر دارند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه نویسنده مسؤول برای اخذ درجه PhD در رشته ایمنی‌شناسی پزشکی از دانشگاه یو پی ام مالزی بود. بدین‌وسیله از همکاری دکتر Stefanie و دکتر Prasad از دانشگاه مریلند تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از دانشکده پزشکی دانشگاه یو پی ام مالزی به خاطر حمایت مالی این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996 Sep;86(6):973-83.

2. Georgel P, Macquin C, Bahram S. The Heterogeneous Allelic Repertoire of Human Toll-Like Receptor (TLR) Genes. PLoS ONE. 2009; 4(11): e7803.

3. Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. Immunol Cell Biol. 2005 Apr;83(2):196-8.

4. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. J Virol. 2004 Aug;78(15):7867-73.

5. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. J Clin Invest. 2000 Feb; 105(4):497-504.

6. Xing-ping W, Shang-zhong X, Xue G, Jun-ya L, Hong-yan R, Zhuo-ma L. Cloning and SNP screening of the *TLR4* gene and the association between its polymorphism and somatic cell score in dairy cattle. S Afr J Anim Sci. 2008; 38(2): 101-9.

7. Noreen M, Shah MA, Mall SM, Choudhary S, Hussain T, Ahmed I, et al. *TLR4* polymorphisms and disease susceptibility. Inflamm Res. 2012 Mar;61(3):177-88.

8. Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, Wolff RK. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. Int J Cancer. 2012 Jun;130(12):2974-80.

9. Izakovicova Holla L, Buckova D, Fassmann A, Roubalikova L, Vanek J. Lack of association between chronic periodontitis and the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in a Czech population. J Periodontal Res. 2007 Aug;42(4):340-4.

10. Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, et al. Analysis of *TLR4* polymorphic variants: new insights into *TLR4*/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. J Immunol. 2006 Jul; 177(1):322-32.

11. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):187-91.

12. Davoodi H, Seow HF. Variant Toll-like receptor4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2011 Jun;10(2):91-9.

13. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jan;95(2):588-93.

14. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011 Mar-Apr; 61(2):69-90.

15. Cario E, Podolsky DK. Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. Mol Immunol. 2005 May; 42(8):887-93.

16. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. *TLR4* signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. Mol Immunol. 2007 Apr;44(11):2850-9.

17. Kobayashi KS, Flavell RA. Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. J Leukoc Biol. 2004 Mar;75(3):428-33.

18. Zarember KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol. 2002 Jan;168(2):554-61.

19. Xia C, Lu M, Zhang Z, Meng Z, Zhang Z, Shi C. *TLRs* antiviral effect on hepatitis B virus in HepG2 cells. J Appl Microbiol. 2008 Nov;105(5):1720-7.

20. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. Infect Immun. 2003 Jun; 71(6):3503-11.

21. An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, *TLR4* and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. Immunology. 2002 May; 106(1):38-45.

Original Paper

Expression of T399I and D299G polymorphisms of *TLR4* gene in colorectal cancer cell line by flowcytometery

Davoodi H (PhD)*[1], Hashemi SR (PhD)[2], Seow HF (PhD)[3]

[1]PhD in Immunology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran.
[2]Assistant Professor, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
[3]Professor, Department of Pathology, Medicine Faculty, UPM University, Malaysia.

Abstract

Background and Objective: Toll-like receptors (TLRs) have been discovered as the most important receptors in innate immunity. One of the most important TLRs is *TLR4*, the key receptor for the LPS component of gram-negative bacteria. Two polymorphisms, D299G (rs4986790) and T399I (rs4986791), in *TLR4* gene are associated with a decreased response to LPS. This study was done to estimate the expression of different polymorphisms of *TLR4* gene in colorectal cancer cell line by flowcytometery.

Materials and Methods: In this laboratory study, the HCT116 cells were transfected with plasmids containing different variants of *TLR4* gene including; Flag-tagged-*TLR4* wild type, flag-tagged D299G and T399I Using TurboFect transfection reagent. Transfection efficiency was evaluated by GFP plasmid. Expression of different variants of *TLR4* was assessed in transfected cells by flowcytometery. Data were analyzed using SPSS-11.5 and chi-square test.

Results: *TLR4* was detected on HT29 and CaCo2 cell lines at low levels. HCT116 cells did not express detectable amounts of *TLR4* by flowcytometery prior to transfection. Gene transfer efficiency for GFP plasmid was about 80% in HCT116 cells by flowcytometery and microscopic analysis. *TLR4* expression and LPS responsiveness significantly was higher in HCT116 cells which were transfected with wild type *TLR4* gene compared to non-transfected and mutant transfected cells ($P<0.05$).

Conclusion: Lower expression of *TLR4* on cells with mutant *TLR4* showed that these polymorphisms affect on expression patterns of *TLR4* on colon cancer cells.

Keywords: *TLR4* gene, Polymorphism, LPS, HCT116 cell line

*** Corresponding Author: Davoodi H (PhD), E-mail: homdavoodi@yahoo.com**

Received 3 April 2012 **Revised** 15 September 2012 **Accepted** 11 November 2012

This paper should be cited as: Davoodi H, Hashemi SR, Seow HF. [Expression of T399I and D299G polymorphisms of *TLR4* gene in colorectal cancer cell line by flowcytometery]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 15(2): 47-53. [Article in Persian]