

میزان بیان پلی مورفیسم D299G و T399I ژن TLR4 در رده سلولی سرطان کولورکتال به روش فلوسایتومتری

دکتر هما داودی*^۱، دکتر سیدرضا هاشمی^۲، دکتر هنگ فنگ سیاو^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 و CaCo2 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 به وسیله 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 ($P < 0.05$).

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 میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، تلفن و نمابر ۰۱۷۱-۴۴۴۰۲۲۵-۴۴۴۰۱۷۱
وصول مقاله: ۹۱/۱/۱۵، اصلاح نهایی: ۹۱/۶/۲۵، پذیرش مقاله: ۹۱/۸/۲۱

مقدمه

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 اسید آمینه است (۶). ژن TLR4 بسیار پلی‌مورفیک است. مطالعات زیادی روی دو پلی‌مورفیسم TLR4 در اگزون شماره ۳ این ژن انجام شده است (۷-۹). این پلی‌مورفیسم‌ها شامل

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

داده شده است (۱۰-۸). پلی مورفیسم‌های موجود در ژن این گیرنده می‌تواند بر میزان بیان، انتقال پیام و القاء همو ستازیس در لومن روده اثر گذار باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر پلی مورفیسم‌های ژن *TLR4* بر بیان واریته‌های مختلف آن در سلول‌های سرطانی کولورکتال (HCT116) و میزان پاسخ‌دهی آنها به LPS با استفاده از روش فلوسایتومتی بود.

روش بررسی

بررسی میزان بیان *TLR4* روی رده‌های سلولی سرطان کولون
در این مطالعه آزمایشگاهی برای بررسی اثر پلی مورفیسم‌های 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 Collection) 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 فلوسایتومتی استفاده شد. در این مرحله رده سلولی مناسب برای انتقال ژن *TLR4* موتان و وحشی انتخاب شد. سپس این سلول‌ها با پلاسمید حاوی ژن‌های مورد نظر 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 مرلند 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 CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پاساژهای اولیه از این سلول‌ها با غلظت 3×10^5 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 انتقال یافته به‌طور

جابجایی باز گوانین با آدنین (SNP rs4986790) است که موجب جابجایی اسید آمینه گلایسین به جای آسپارتیک اسید در اسید آمینه شماره ۲۹۹ (D299G) می‌شود. همچنین جابجایی تیمین با سیتوزین (SNP rs4986791) که موجب جابجایی اسید آمینه ایزولوسین با ترئونین در اسید آمینه شماره ۳۹۹ (T3991) می‌شود (۱۰). این پلی مورفیسم‌ها 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 پلی مورفیسم‌ها (D299G, T3991) 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 پلی مورفیسم‌های ژن کدکننده *TLR4* می‌تواند ارتباط بین این پلی مورفیسم‌ها و بیماری‌های انسان را نشان دهد (۱۲ و ۱۳). در مطالعات متعددی همراهی این پلی مورفیسم‌ها 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 (۱۵ و ۱۶). *TLR2* با لیوپروتین، *TLR4* با لیوپولی ساکارید، *TLR5* با فلاژلین و *TLR9* با CpG DNA 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 ارگانسیم‌های 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 مواجهه با پاتوژن‌ها ارائه دهد. اگرچه پاسخ ایمنی ذاتی در کنترل عفونت ایجاد شده توسط میکروارگانسیم‌های 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

بررسی راندمان انتقال ژن (الف) آنالیز میکروسکوپی

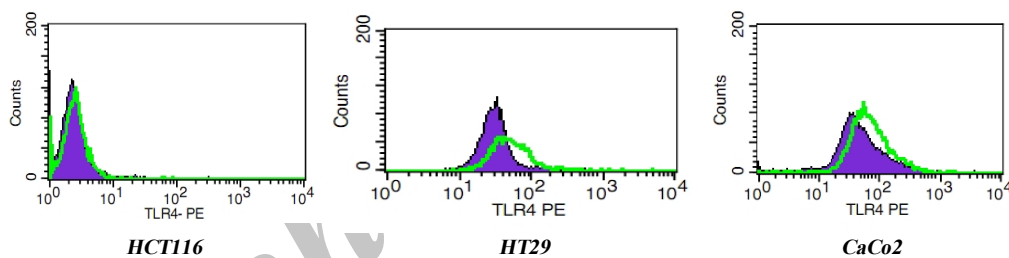
برای بررسی راندمان انتقال ژن به سلول از پلاسمید Pmax GFP استفاده شد. سلول‌ها به همان روشی که در بالا ذکر شد؛ کشت داده شدند. در هر یک از چاهک‌ها یک لامل استریل قرار داده شد و سلول‌ها روی لامل کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت از زمان انتقال ژن لامل‌ها با یک پنس برداشته شده و به صورت وارونه روی لام قرار گرفتند. 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

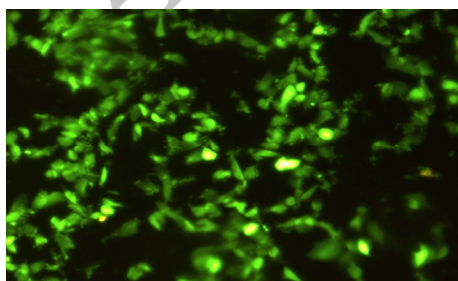
سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند. سپس با پلاسمید Pmax GFP و معرف Turbofect مجاور شدند. پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها در ۴۰۰ میکرولیتر PBS/BSA جمع‌آوری شده و درصد سلول‌های بیان‌کننده فلورسنت سبز به وسیله فلوسایتومتری بررسی گردید.

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

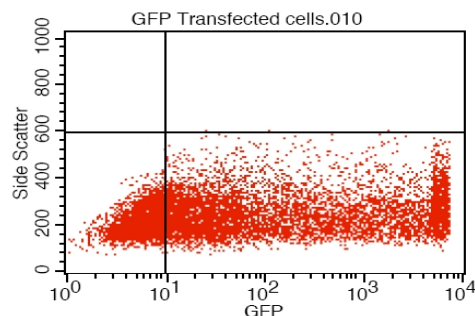
مقدار ۱/۵ میکروگرم از DNA پلاسمید در ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI فاقد سرم رقیق شد. مقدار ۶ میکرولیتر از معرف Turbofect به DNA پلاسمید رقیق شده اضافه شد و ترکیب حاصله به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از ترکیب DNA پلاسمید و معرف Turbofect به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و در 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 موثبات مورد استفاده قرار گرفتند.



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* ردیابی نگردید.



آنالیز میکروسکوپی



فلوسایتومتری

شکل ۲: بیان پروتئین GFP ۲۴ ساعت پس از انتقال ژن به سلول‌های *HCT116* با یک میکروگرم پلاسمید Pmax 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.

ج) رنگ آمیزی سلول های بیان کننده *TLR4* با آنتی بادی اختصاصی

پس از ۴۸ ساعت از زمان انتقال ژن به سلول، سلول ها ترپسینه شده و در نهایت یک سوسپانسیون سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر PBS تهیه شد. مقدار یک میکروگرم آنتی بادی ضد *TLR4* (BD Biosciences) به سلول ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شدند. پس از گذشت زمان ۳۰ دقیقه، سلول ها با یک میلی لیتر 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 آنتی بادی ثانویه (BD Biosciences, mouse PE-conjugated anti human IgG) تکرار شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

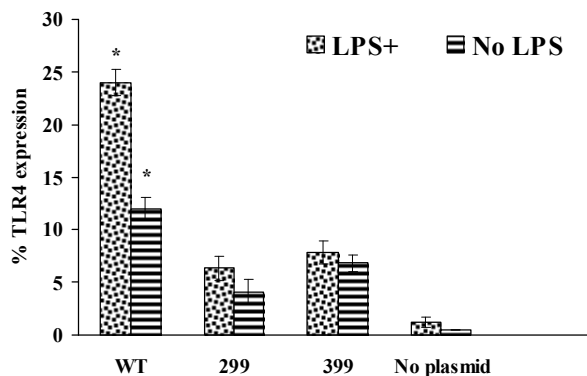
داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-11.5 و آزمون Chi-Square تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج آزمایش های فلوسایتومتري نشان داد که بیان ژن *TLR4* در سلول های HCT116 در سطح پایینی است. به طوری که قابل ردیابی به روش فلوسایتومتري نبود. در حالی که سلول های HT29 و CaCo2 به میزان کم *TLR4* را بیان کردند (شکل یک). بررسی راندمان انتقال ژن به وسیله آنالیز میکروسکوپی و فلوسایتومتري در سلول های HCT116 نشان داد که حدود ۸۰ درصد سلول ها ژن GFP را دریافت کرده اند (شکل ۲).

بیان *TLR4* روی سلول های HCT116 و پاسخ دهی این سلول ها به LPS پس از ۴۸ ساعت انتقال ژن به سلول ها با روش فلوسایتومتري در شکل ۳ نشان داده شده است. سلول هایی که ژن وارسته وحشی را دریافت کرده بودند؛ با میانگین بیان ۲۴ درصد با انحراف معیار حدود ۱/۱۸ در مقایسه با انواع موتان (۶ و ۷ درصد) و همین طور سلول هایی که ژن دریافت نکرده بودند (۱/۵ درصد) به صورت معنی داری بیان بیشتری نشان دادند ($P < 0.05$).

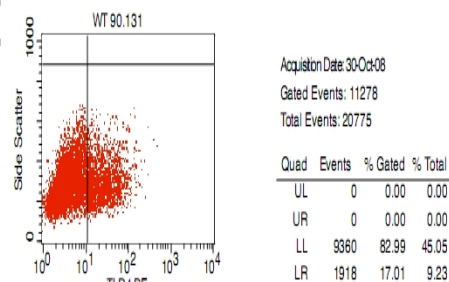
در پاسخ به LPS در همه سلول ها بیان گیرنده افزایش یافت؛ اما این افزایش در سلول هایی که ژن وارسته وحشی *TLR4* را دریافت کرده بودند؛ معنی دار بود ($P < 0.05$) و در سلول هایی که ژن های وارسته موتان را دریافت کرده بودند و نیز در گروه کنترل معنی دار نبود. بیشترین سطح بیان *TLR4* پس از ۶۰ دقیقه تیمار با LPS در سلول های دارای نوع وحشی ردیابی گردید. میزان بیان این گیرنده در دو نوع سلول موتان تفاوت آماری معنی داری نداشت؛ اما تفاوت این سلول ها با سلول های کنترل از نظر بیان *TLR4* معنی دار بود ($P < 0.05$).



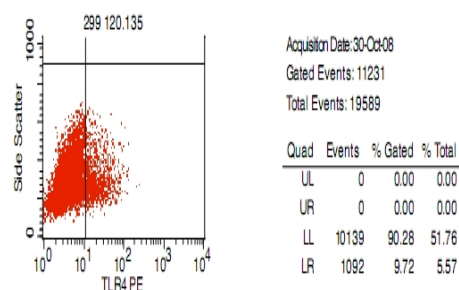
شکل ۳: آنالیز فلوسایتومتري بیان *TLR4* روی سلول های HCT116 ۴۸ ساعت پس از دریافت پلاسمید حاوی ژن های مختلف *TLR4* و مجاورت با LPS به مقدار یک میکروگرم بر میلی لیتر به مدت یک ساعت.

داده ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد در سطح معنی دار ۰/۰۵ بیان شده است. همه انواع سلول ها بیان گیرنده را در پاسخ به LPS افزایش دادند؛ اما میزان این افزایش تنها در سلول های دریافت کننده ژن وحشی معنی دار بود.

WT سلول دریافت کننده ژن نوع وحشی، ۲۹۹ سلول دریافت کننده ژن نوع موتان D299G، ۳۹۹ سلول دریافت کننده ژن موتان T399I نوع



نوع وحشی (WT)



نوع موتان (۲۹۹)

شکل ۴: آنالیز فلوسایتومتري بیان *TLR4* در سلول هایی که پلاسمید حاوی ژن وارسته وحشی و موتان به آنها منتقل شده است. میزان بیان در سلول هایی که نوع وحشی را دریافت کرده؛ تقریباً دو برابر سلول هایی است که ژن موتان را دریافت کرده است.

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پلی مورفیسیم های *TLR4* بر میزان بیان این گیرنده و پاسخ دهی به LPS بود. در این مطالعه سلول های HCT116 که پلاسمید حاوی ژن های مختلف *TLR4* را دریافت کرده بودند؛ این گیرنده را روی سطح خود بیان کردند. میزان بیان نوع وحشی گیرنده به طور معنی داری بیشتر از نوع موتان بود و انواع وحشی در پاسخ به LPS به طور معنی دار بیان گیرنده را افزایش دادند. بیان نوع وحشی *TLR4* روی سلول های HCT116 بعد از انتقال پلاسمید و تحریک با LPS، در شرایط بهینه کمتر از ۳۰ درصد بود و برای انواع موتان تقریباً نصف این مقدار بود.

مکانیسم کاهش پاسخ دهی 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 پلی مورفیسیم ها باعث کاهش پاسخ دهی به LPS استنشاقی می شوند. به طوری که وارد کردن ژن وحشی *TLR4* به سلول های اپیتلیال راه های هوایی یا ماکروفاژهای ریه در افراد دارای *TLR4* موتان باعث برطرف شدن این اختلال می شود (۱۱). در مطالعه ما نیز حساسیت گیرنده های موتان به تحریک با LPS نسبت به نوع وحشی کاهش آماری معنی داری نشان داد. حال این که کاهش حساسیت موتان های *TLR4* به LPS باکتری های گرم منفی و کاهش بیان انواع موتان نسبت به وحشی چه تاثیرات احتمالی روی استعداد افراد به ابتلاء به بیماری های عفونی، التهاب های مزمن و سرطان های مختلف از جمله سرطان کولورکتال دارد؛ نیاز به پژوهش های بیشتری در این زمینه دارد.

نتیجه گیری

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

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه نویسنده مسؤول برای اخذ درجه PhD در رشته ایمنی شناسی پزشکی از دانشگاه یو پی ام مالزی بود. بدین وسیله از همکاری دکتر Stefanie و دکتر Prasad از دانشگاه مرلند تقدیر و تشکر می گردد. همچنین از دانشکده پزشکی دانشگاه یو پی ام مالزی به خاطر حمایت مالی این تحقیق سپاسگزاری می گردد.

References

- 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.
- Georgel P, Macquin C, Bahram S. The Heterogeneous Allelic

نتیجه یکی از آزمایش های فلوسایتومتری *TLR4* در سلول هایی که ژن های وارته 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

گیرنده های *TLRs* دائماً بر سطح سلول هایی که احتمالاً اولین سد برخورد با آنتی ژن هستند؛ بیان می شوند. سلول های فاگوسیت کننده مانند ماکروفاژها، نوتروفیل ها و سلول های دندریتیک مهم ترین مخازن این گیرنده ها بوده و مقادیر بالایی از این گیرنده ها را بیان می کنند (۱۸). اخیراً گزارش شده که بیان این گیرنده ها تنها به سلول های ایمنی محدود نشده و قسمت اعظم سلول های بدن می توانند حداقل یک گروه از *TLRs* را بیان کنند (۱۹). نتایج مطالعه حاضر با فلوسایتومتری نشان داد که *TLR4* روی سلول های HCT116 بیان نمی شود و روی سلول های HT29 و CaCo2 در سطح بسیار پایین بیان می شود. سطح پایین بیان *TLR4* روی این سلول ها به عنوان سلول های اپیتلیال روده نشان دهنده تولرانسی است که طی مراحل تکامل، سلول های اپیتلیال روده به باکتری های گرم منفی ساکن روده نشان داده اند. این موضوع احتمالاً یکی از مکانیسم هایی است که موجب تولرانس به اندوتوکسین باکتری های گرم منفی روده می شود (۱۷). در مطالعه Suzuki و همکاران سلول های اپیتلیال روده انسان براساس بیان *TLR4* به سه دسته سلول های با بیان کم مثل HCT116، سلول هایی که *TLR4* را روی سطح سلول در حد ردیابی (SW480) بیان می کنند و سلول هایی که *TLR4* را به صورت سیتوپلاسمی (Colo205) بیان می کنند؛ تقسیم گردید (۲۰). در مطالعه ما هم بیان *TLR4* روی سلول های HCT116 بدون پلاسمید و بدون تحریک با LPS قابل ردیابی با روش فلوسایتومتری نبود. به همین خاطر این سلول برای بیان ژن های 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 سلول های دندریتیک به تحریک با LPS باعث افزایش بیان *TLR4* گردید (۲۱). در مقابل He و همکاران نشان دادند که سلول های سرطانی ریه انسان تحت تاثیر تحریک با LPS قرار نگرفته و سطح بیان *TLR4* در جواب به LPS تغییر معنی داری نداشت (۱۶). این مطالعات نشان می دهد که پاسخ به LPS در سلول های مختلف براساس نوع و عملکرد بافت متفاوت است.

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, Arditì 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. Zarembek 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.

Archive

Original Paper

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

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

¹PhD in Immunology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, Iran.

²Assistant Professor, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

³Professor, 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 flowcytometry.

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 flowcytometry. 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 flowcytometry prior to transfection. Gene transfer efficiency for GFP plasmid was about 80% in HCT116 cells by flowcytometry 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