The Effects of Retinoic Acid on the Expression of HNF4α and Cdx-2 Genes in Caco-2 Cells as a Model of Intestinal Barrier

Mahshad Karambeigi[1], Hadi Cheraghi[2], Arash Alizadeh[3],

1. Graduate Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3417-4223

2. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-83-38320041, Email: h.cheraghi@razi.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-2026-3292

3. Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8635-8000

ABSTRACT

Background and Aim: Retinoic acid (RA) is involved in protecting the intestinal barrier, inducing differentiation, growth and proliferation of epithelial cells. There are several hypotheses about the mechanism of induction of apoptosis by RA, but few studies have been performed on the role of HNF4α and Cdx-2 in intestinal cells. The aim of this study was to evaluate the survival and expression of these two genes following administration of RA in Caco-2 cells as a model of intestinal epithelial cells.

Materials and Methods: In the present study, Caco-2 cells were used and exposed to retinoic acid at concentrations of 10, 20, and 40 µM for 72 hours. After incubation for 24 and 48 hours, these samples were assigned to evaluate the effects of cytotoxicity by measuring mitochondrial enzyme activity using the MTT method. The expression levels of HNF4α and Cdx-2 genes at the mRNA level were examined by real-time PCR technique.

Results: The results showed that 48 hours after adding 20 and 40 µM RA, the number of cells decreased in a concentration-dependent manner. In the first 24 and 48 hours, the dependence on the expression concentration of the HNF4α gene increased, and in contrast, the expression of the Cdx-2 gene decreased during these hours. Based on the results obtained during the 72 hours of the study, the expression levels of the genes decreased compared to those in the control which was due to the reduction of living cells and disruption of cellular homeostasis.

Conclusion: Use of RA in high concentrations can cause disruption of intestinal homeostasis due to an imbalance between the two genes. Therefore, concentration of retinoic acid derivatives should be selected according to the purpose of treatment.

Keywords: Retinoic acid, HNF4α, Cdx-2, Intestinal barrier, Caco-2

Received: May 20, 2022 **Accepted:** July 6, 2022

How to cite the article: Mahshad Karambeigi, Hadi Cheraghi, Arash Alizadeh**.** The Effects of Retinoic Acid on the Expression of HNF4α and Cdx-2 Genes in Caco-2 Cells as a Model of Intestinal Barrier.ŚJKU 2023;28(4):1-11.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

بررسی تأثیرات اسیدرتینوئیک بر بیان ژن‌های HNF4α و Cdx-2 در سلول‌های Caco-2 به‌عنوان مدلی از سد روده‌ای

مهشاد کرم‌بیگی[۱]، **هادی چراغی**[۲]، **آرش علی‌زاده**[۳]

۱. فارغ‌التحصیل دکتری عمومی، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۴۱۷-۴۲۲۳

۲. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، پست الکترونیک: h.cheraghi@razi.ac.ir، **تلفن:** ۰۸۳-۳۸۳۲۰۰۴۱، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۰۲۶-۳۲۹۲

۳. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۶۳۵-۸۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: اسیدرتینوئیک (RA) در محافظت از سد روده‌ای، القای تمایز، تکثیر سلول‌های اپیتلیالی نقش بسزایی دارد. در مورد مکانیسم القای آپوپتوز توسط RA فرضیات متعددی وجود دارد؛ اما مطالعات چندانی در رابطه با نقش HNF4α و Cdx-2 در سلول‌های روده‌ای صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی زنده‌مانی و بیان دو ژن اشاره شده متعاقب تجویز RA در سلول‌های Caco-2 به عنوان مدلی از سلول‌های اپیتلیال روده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر از سلول‌های Caco-2 استفاده شد که به مدت ۷۲ ساعت در معرض اسیدرتینوئیک با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار قرار داشتند. این نمونه‌ها، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت به منظور انجام تست و بررسی اثرات سمیت سلولی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم میتوکندریایی و با استفاده از روش MTT تعیین شدند. بیان ژن‌های $HNF_4\alpha$ و Cdx-2 در سطح mRNA با تکنیک پی‌سی‌آر در زمان حقیقی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد ۴۸ ساعت پس از افزودن ۲۰ و ۴۰ میکرومولار RA، تعداد سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت. در ساعات ۲۴ و ۴۸ اولیه وابستگی به غلظت بیان ژن $HN_F4\alpha$ افزایش یافت و در مقابل، بیان ژن Cdx-2 نیز در این ساعات میزان نزولی داشت. بر اساس نتایج به دست آمده طی ۷۲ ساعت مطالعه، مشاهده شد که به دلیل کاهش سلول‌های زنده و برهم خوردن هموستاز سلولی، بیان ژن‌ها نسبت به کنترل کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: استفاده از RA در غلظت‌های بالا می‌تواند باعث برهم خوردن هموستاز روده به واسطه عدم تعادل بین دو ژن مورد مطالعه باشد؛ لذا در تجویز مشتقات اسیدرتینوئیک باید با توجه به هدف از درمان غلظت را انتخاب کرد.

کلمات کلیدی: اسیدرتینوئیک، $HNF_4\alpha$، Cdx-2، سد روده‌ایی، Caco-2

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۲/۳۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۴/۱۱ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۱۵

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

مقدمه

روده، ارگانی است که به طور مداوم در حال تکثیر بوده و سلول‌های آن در طی یک هفته جایگزین می‌شوند. سد اپیتلیال روده نوعی پوشش داخلی روده است که انواع مختلفی از سلول‌های اپیتلیال را شامل می‌شود. در زیر لایه اپیتلیال، نوعی لایه نازک از بافت همبند وجود دارد که نقش مهمی در پرورش ارتباطات سالم بین میکروارگانیسم‌ها و سلول‌های ایمنی ایفا می‌کند. پروتئین‌های اتصال محکم اپیتلیال، اصلی‌ترین جزء اتصالات درون سلول‌های اپیتلیال بشمار می‌آیند که باعث محدود شدن فضای بی سلولی و حمل‌ونقل‌های مولکول‌ها می‌شوند بررسی میزان نفوذپذیری روده نسبت به مواد و ترکیبات، با توجه به اهمیت سلول‌های اپیتلیال و سد مربوط به این سلول‌ها، می‌تواند اطلاعات مفیدی را در مورد پیش‌آگهی بیماران و یا افراد در معرض خطر در اختیار پزشکان قرار دهد(۲و ۱).

اسید رتینوئیک (Retinoic acid) یکی از متابولیت‌های فعال ویتامین A است. غلظت فیزیولوژیک این متابولیت، در پلاسمای انسان ۱۴-۴ نانومول در لیتر است. اسیدرتینوئیک (RA) با انتشار ساده وارد سلول شده و به گیرنده داخل هسته‌ای متصل می‌شود. این متابولیت، در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز و واکنش ایمنی و بینایی نقش مهمی داشته و باعث انسجام و یکپارچگی اپیتلیال می‌شود(۳). علاوه بر این، می‌تواند تعداد سلول‌های ایمنی را برای افزایش پاسخ‌های ایمنی روده بهبود بخشیده و ایمنی مخاطی روده و هوموستاز آن را تنظیم کند(۴). یکی از ویژگی‌های مهم ویتامین A، توان آنتی‌اکسیدانی آن است که در التهابات به کمک سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن آمده و از پیشرفت التهابات به‌واسطه رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند(۵). نتایج یکی از متاآنالیزهای قبلی نشان داد که درمان با مکمل‌های حاوی ویتامین A، خطر مرگ‌ومیر ناشی از اسهال را در کودکان در کشورهای درحال‌توسعه را کاهش می‌دهد(۶). با این‌حال، عملکرد دقیق RA در تنظیم فعالیت‌های روده‌ای و همچنین گیرنده‌های آن که اثرات محافظتی را در تک‌لایه سلول‌های اپیتلیال روده تنظیم می‌کنند، هنوز ناشناخته است.

ژن عامل ۴ آلفای هسته هپاتوسیت ($HNF_4\alpha$) نوعی فاکتور رونویسی هسته‌ای است که متعلق به خانواده‌های گیرنده هورمون استروئید/ تیروئید بوده و طی سال‌های اخیر $HNF_4\alpha$ به‌عنوان بیومارکری برای التهابات و سرطان‌های GI مطرح شده و در درمان بیماری‌های GI و سرطان‌های مربوط به آن، به‌عنوان نوعی هدف درمانی مورداستفاده قرار گرفته است(۷). این ژن عامل، در ابتدا به‌عنوان یک فاکتور رونویسی غنی شده از کبد شناخته می‌شد؛ اما امروزه مشخص شده که در اپیتلیوم دستگاه گوارش، لوزالمعده و کلیه نیز بیان می‌شود. پروتئین کدگذاری شده توسط این ژن بیان چندین ژن از جمله فاکتور هسته‌ای کبدی سلول‌های ۱ آلفا ($HNF_1\alpha$) و ژن‌های مرتبط با سنتز و متابولیسم چربی‌ها نیز نقش دارد(۸). همچنین مهار بیان ژن $HNF_4\alpha$ در روده بزرگ در دوران جنینی منجر به عدم تولید کریپت‌های طبیعی و تأثیرگذاری بر بیان چندین ژن مهم در رشد روده‌ای می‌شود(۹). یکی از نقش‌های مهم ژن $HNF_4\alpha$ تنظیم انتقال یون‌های موکوسی در مخاط روده می‌باشد که در نتیجه التهاب طولانی‌مدت و مزمن در GI کاهش بیان این تنظیم‌کننده رونویسی مشاهده شده و در نهایت منجر به پیشرفت بیماری می‌شود(۱۰).

$HNF_4\alpha$ به پروموتور Cdx-2 متصل شده و نقش اساسی در رشد جنین پستانداران دارد؛ اما در پستانداران بالغ، بیان Cdx-2 به روده کوچک و بزرگ محدود می‌شود(۱۱). بیان Cdx-2 در سرطان‌های کولورکتال به نسبت درجه تومور کاهش یافته و در کارسینومای روده بزرگ با حداقل تمایز از بین می‌رود. علاوه بر این، Cdx-2 توسط مسیرهای انکوژنیک در سلول‌های سرطانی روده بزرگ نیز تنظیم می‌شود(۱۲)؛ که همه مشاهدات حاکی از آن است که Cdx-2 عملکرد سرکوبگر تومور دارد؛ لذا بررسی بیان این

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

ژن در کنار $HNF_4\alpha$ می‌تواند در پیگیری بیماران و پیش بینی آینده بیماری سودمند باشد.

هدف این پروژه مشخص کردن اثرات اسید رتینوئیک بر روی بیان ژن $HNF_4\alpha$ و Cdx-2 در سلول‌های روده‌ای است که بدین منظور از رده سلولی Caco-2 استفاده شد. رده سلولیCaco-2 (سلول‌های سرطانی کولون) به دلیل اینکه به‌صورت تک لایه رشد کرده و از نظر ظاهری و خواص بیوشیمیایی شبیه به سلول‌های اپیتلیال روده است می‌تواند به‌عنوان مدلی مناسب برای بررسی سد روده‌ای مورداستفاده قرار گیرد(۱۳). با توجه به اینکه اطلاعاتی در مورد تغییرات بیان ژن HNF4α در تجویز ویتامین A و یا متابولیت‌های آن در سلول‌های روده‌ای وجود ندارد؛ لذا در این مطالعه تأثیر RA بر بیان ژن HNF4α و Cdx-2 در رده سلولی Caco-2 که مدلی از سلول‌های روده‌ای برای بررسی سد روده‌ای است، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

رتینوئیک اسید تمام ترانس از شرکت سیگما (Sigma) خریداری و با غلظت ۳ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر اتانول ۹۹ درصد شرکت مرک حل شد که غلظت ۱۰ میلی‌مولار داشت. در ادامه از غلظت ۱۰ میلی‌مولار غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار تهیه و به منظور درمان سلول‌ها از آن استفاده شدند. در این مطالعه تجربی (مداخله‌ای)، سلول‌ها، برای بررسی تأثیر رتینوئیک اسید بر سلول‌های سرطان کلورکتال (Caco-2)، در حضور غلظت‌های آماده‌شده به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند.

کشت سلول:

رده سلولی Caco2 از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و یک درصد محلول آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین(Gibco) کشت داده شده و در انکوباتور تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. سلول‌ها در فلاسک‌های t25 کشت داده شدند. بعد از جداسازی سلول‌ها از ته فلاسک، سانتریفوژ (دور ۱۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) با دور ۱۲۰۰۰ انجام شد. در ادامه سلول‌های جدا شده در هر پلیت شش خانه کشت داده شده و با رقت‌های مختلف اسیدرتینوئیک به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند.

بررسی سمیت سلولی:

جهت بررسی اثر سمیت اسیدرتینوئیک بر میزان بقای سلول‌های Caco-2 از تکنیک MTT (دی متیل تیازول ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) استفاده شد. سنجش MTT نوعی روش رنگسنجی و بر پایه تبدیل نمک زرد رنگ تترازولیوم MTT به محصول فورامازان بنفش رنگ توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد. این تبدیل فقط توسط سلول‌های زنده انجام می‌شود و میزان فورامازان تولید شده با میزان سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک افزوده شده و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سلیسوس انکوبه شد. سپس مایع رویی از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه خارج و DMSO نیز به منظور حل شدن بلورهای تشکیل شده در ته چاهک، اضافه شد. جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد.

بررسی بیان ژن‌های HNF4α و Cdx-2 با استفاده از تکنیک PCR در زمان حقیقی:

RNA تام سلولی با استفاده از محلول ترایزول استخراج شد. کمیت RNA به وسیله جذب نوری نمونه‌ها در ۲۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر ماورابنفش تعیین شده و واکنش نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA) با استفاده از آغازگرهای(dT) Oligo و Random Hexamers طبق پروتکل استاندارد کیت یکتا تجهیز آزما صورت گرفت. بر این اساس، واکنش نسخه‌برداری معکوس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شده و در نهایت آنزیم نسخه بردار معکوس در دمای ۸۵ درجه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

سلسیوس به مدت ۵ ثانیه غیرفعال گردید و نمونه‌ها تا زمان انجام پی‌سی‌آر به فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. برای بررسی میزان بیان ژن‌ها، پرایمرهای مورد نیاز به همراه پرایمر ژن مرجع از مقالات مختلف و توسط نرم افزار آنلاین BLAST-Primer بررسی و انتخاب شدند (جدول۱). به‌منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های از آزمون PCR در زمان حقیقی، روش مقایسه‌ای ΔΔCt و دستگاه Rotorgen (شرکت Qiagen) استفاده شد. روش آزمون بر پایه رنگ آزاد فلورسنت و کیت تجاری آزمون PCR در زمان حقیقی شرکت یکتا تجهیز آزما استوار بود.

تجزیه و تحلیل آماری:

داده‌ها با استفاده از نرم افزار گراف پد پریسم نسخه ۹ و به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. این داده‌های ارائه شده، توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و برای ارزیابی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شده‌اند.

یافته‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدرتینوئیک بر زنده‌مانی سلول‌های Caco-2:

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی سمیت سلولی (MTT)، غلظت‌های مختلف RA، در ۲۴ ساعت اول سمیتی بر روی سلول‌ها نداشته ولی پس از ۴۸ ساعت مشخص شد که تمام غلظت‌های اسید رتینوئیک بر روی سلول‌ها به شکل واضحی اثر گذاشته و باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شده است به صورتی که این کاهش در غلظت بالای RA محسوس‌تر بود (نمودار۱).

تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدرتینوئیک بر بیان ژن HNF4α

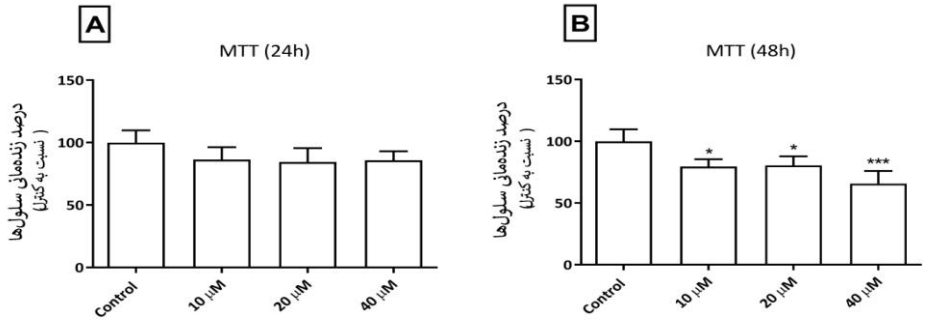
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از بیان ژن $HNF_4\alpha$ در سطح mRNA مشخص شد که پس از گذشت ۲۴ ساعت، گروه دریافت‌کننده غلظت ۲۰ و ۴۰ میکرومول نسبت به گروه کنترل افزایش بیان ژن HNF4α (P<۰۰۰۱/۰) داشته است. ولی در گروه دریافت‌کننده غلظت پایین RA در مقایسه با گروه کنترل، تغییرات معنی‌دار نبود. علاوه بر این، مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که برخلاف سایر گروه‌های آنالیز، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و ۱۰ میکرومول وجود ندارد. بر اساس نتایج آمده در ۴۸ و ۷۲ ساعت مطالعه، هر سه گروه دریافت‌کننده اسیدرتینوئیک پس از ۴۸ ساعت اولیه، نسبت به گروه کنترل به شکل واضحی (P<۰۰۰۱/۰) در سطح m-RNA افزایش بیان ژن HNF4α داشته‌اند. این اختلاف در گروه دریافت‌کننده ۱۰ میکرومول چشمگیرتر (P<۰۰۰۱/۰) بوده؛ ولی در گروه دریافت‌کننده غلظت بالا RA میزان بیان ژن در مقایسه با غلظت‌های پایین ۴۸ ساعت پس از درمان با RA، بیشتر به گروه کنترل نزدیک‌تر بوده است. ۷۲ ساعت پس از درمان، میزان بیان ژن موردنظر در گروه دریافت‌کننده RA با غلظت ۲۰ میکرو مول نسبت به گروه کنترل چشم‌گیر نبوده و RA نتوانسته میزان بیان ژن HNF4α را تغییر دهد. این در حالی است که غلظت‌های بالا و پایین، ۷۲ ساعت بعد از اضافه کردن RA، نسبت به گروه کنترل بیان ژن کمتری داشته‌اند. (شکل ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

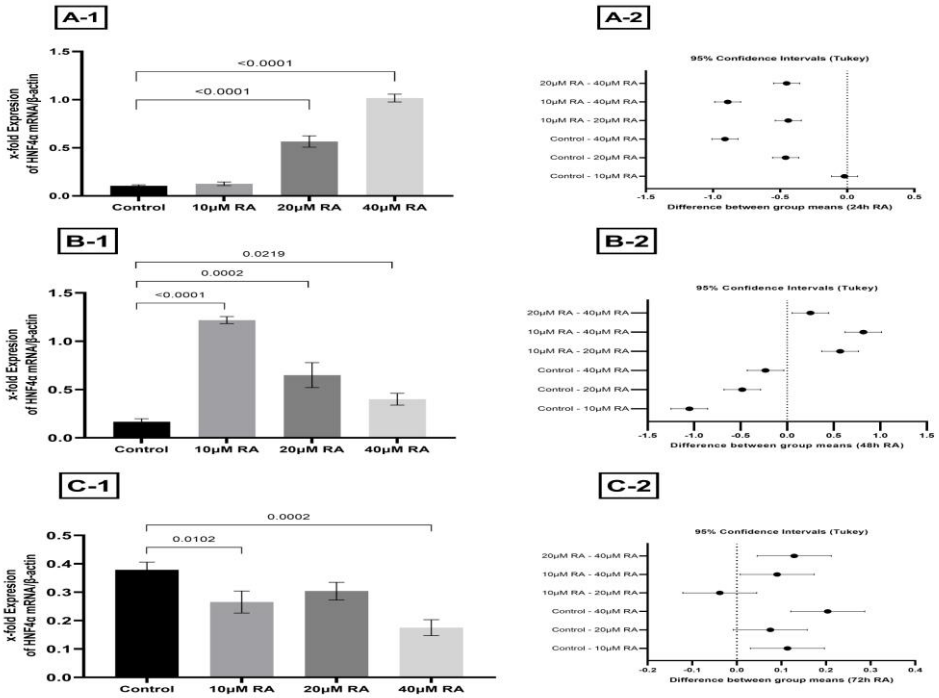
Primer	Sequence	R
HNF4α	Forward: 5'- GTGCTGCTCCTAGGCAATGA -3' Revers: 5'- ACTCAGCCCCTTGGCATCT -3'	(۲۸)
Cdx-2	Forward: 5'- ACTGCGGTTCTGAAACCAGATT -3' Revers: 5'-CTGATGTACCAGTTGGGGAACTAT -3'	(۲۹)
β Actin	Forward: 5'- TGGCACCCAGCACAATGAA -3' Revers: 5'- CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA -3'	(۳۰)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]



نمودار ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌ها درگروه‌های مختلف مطالعه. A. بررسی زنده مانی سلول‌ها پس از طی ۲۴ ساعت، B. پس از طی ۴۸ ساعت درمان با اسید رتینوئیک. گروه کنترل: سلول‌های در معرض حلال، گروه 10µM: سلول‌های در معرض ۱۰میکرومولار اسید رتینوییک، گروه 20µM: سلول‌های در معرض ۲۰میکرومولار اسید رتینوییک، گروه 40µM: سلول‌های در معرض ۴۰ میکرومولار اسید رتینوییک. درصد بقای سلولی با روش MTT محاسبه شده است. در هر گروه، هر ستون نمودار نشان دهنده مقادیر میانگین±انحراف معیار درصد بقای سلولی است. ($P\leq0.05$*، $P\leq0.001$***)



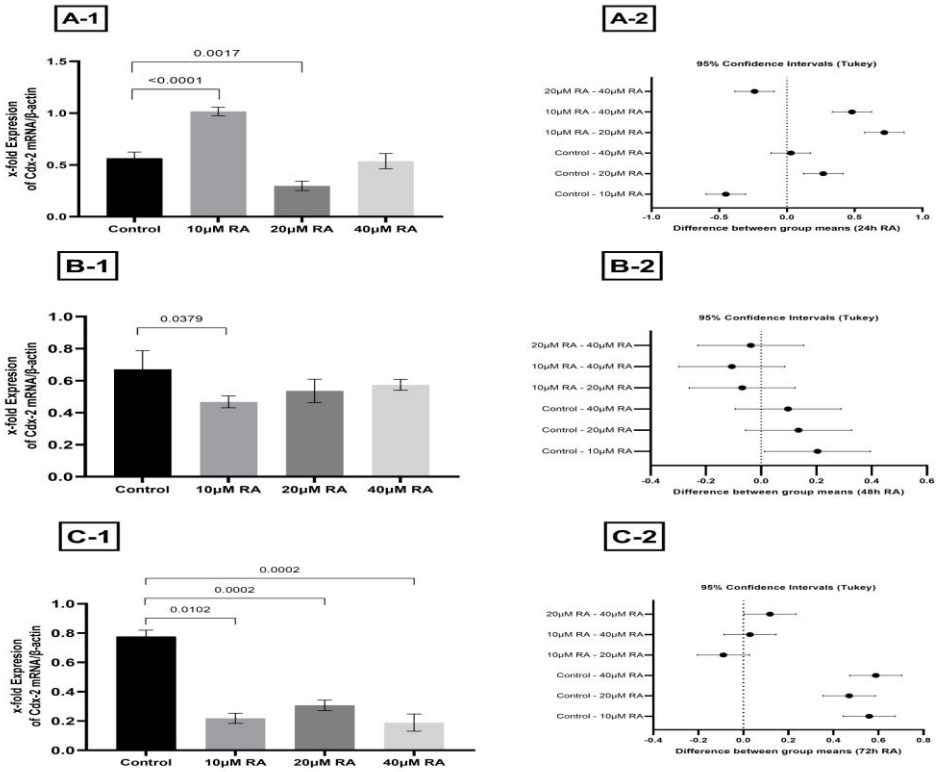
شکل ۱. بررسی میزان تغییرات بیان ژن HNF4α در گروه‌های دریافت‌کننده اسیدرتینوئیک. گروه کنترل: سلول‌های در معرض حلال، گروه 10µM: سلول‌های در معرض ۱۰میکرومولار اسید رتینوییک، گروه 20µM: سلول‌های در معرض ۲۰میکرومولار اسید رتینوییک، گروه 40µM: سلول‌های در معرض ۴۰ میکرومولار اسیدرتینوییک. بیان ژن با استفاده از تکنیک پی‌سی‌آر در زمان حقیقی بررسی شده است. نتایج پس از ۲۴ ساعت (A-1)، پس از ۴۸ ساعت (B-1)، پس از ۷۲ ساعت (C-1) پس از درمان با اسیدرتینوئیک آورده شده است که مقایسه غلظت‌های مختلف در هر نمونه‌گیری با گروه کنترل در همان ساعت است. مقایسه بیان ژن HNF4α بین گروه‌های دریافت‌کننده RA بعد از ۲۴ (A-2)، پس از ۴۸ ساعت (B-2)، پس از ۷۲ ساعت (C-2) با استفاده از تست تعقیبی Tukey و سطح معنی‌داری ۹۵ درصد که خط میانه عمود در صورت قطع هر یک از تغییرات نشان از عدم معنی داری بین آن دو گروه است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدرتینوئیک بر بیان ژن Cdx-2

بر اساس نتایج، افزایش معنی‌داری در آنالیز بیان ژن Cdx-2 در گروه دریافت‌کننده RA با غلظت ۱۰ میکرو مول نسبت به گروه کنترل دیده شد. در مقابل، در گروه غلظت بالای RA تغییرات تا ۲۴ ساعت معنی‌دار نبوده و حتی در گروه دریافت‌کننده غلظت ۲۰ میکرو مول نیز بیان ژن Cdx-2 کاهش معنی‌دار (P=۰۰۱۷/۰) نسبت به گروه کنترل داشت. نتایج مقایسه بین گروه‌ها در میزان بیان ژن Cdx-2 در سطح mRNA بعد از ۲۴ ساعت از شروع مطالعه نشان داد که اختلاف چشم‌گیری (P<۰۵/۰) در بین همه گروه‌ها به جز دو گروه کنترل و غلظت ۴۰ میکرو مول وجود دارد. علاوه بر این، نتایج آنالیز بیان ژن Cdx-2 بعد از ۴۸ ساعت نشان داد که فقط در گروه ۱۰ میکرو مول نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود داشته و در گروه‌های دیگر، تفاوت چشم‌گیری مشاهده نشد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، مشاهده شد که هر سه گروه دریافت‌کننده اسیدرتینوئیک نسبت به گروه کنترل در سطح m-RNA به‌صورت معنی‌داری (P<۰۰۰۱/۰) کاهش بیان ژن Cdx-2 داشته‌اند (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی میزان تغییرات بیان ژن Cdx-2 در گروه‌های دریافت‌کننده اسیدرتینوئیک. گروه کنترل: سلول‌های در معرض حلال، گروه 10μM: سلول‌های در معرض ۱۰میکرومولار اسید رتینوییک، گروه 20μM: سلول‌های در معرض ۲۰میکرومولار اسید رتینوییک، گروه 40μM: سلول‌های در معرض ۴۰ میکرومولار اسیدرتینوییک. بیان ژن با استفاده از تکنیک پی‌سی‌آر در زمان حقیقی بررسی شده است. نتایج بیان ژن Cdx-2 پس از ۲۴ ساعت (A-1)، پس از ۴۸ ساعت (B-1)، پس از ۷۲ ساعت (C-1) پس از درمان با اسیدرتینوئیک آورده شده است که مقایسه غلظت‌های مختلف در هر نمونه‌گیری با گروه کنترل در همان ساعت می‌باشد. مقایسه بیان ژن Cdx-2 بین گروه‌های دریافت‌کننده RA بعد از ۲۴ (A-2)، پس از ۴۸ ساعت (B-2)، پس از ۷۲ ساعت (C-2) با استفاده از تست تعقیبی Tukey و سطح معنی‌داری ۹۵ درصد که خط میانه عمود در صورت قطع هر یک از تغییرات نشان از عدم معنی داری بین آن دو گروه است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

بحث

اپیتلیوم روده با ایجاد سدی فیزیکی بین محفظه‌های خارجی و داخلی، نقشی اساسی در جذب و انتقال مواد مغذی دارد. چنین عملکردهایی، در تجدید مداوم بافت، به معماری عملکردی سلول‌های اپیتلیال و همچنین به کنترل پیچیده و دقیق تکثیر، تمایز و آپوپتوز برای اطمینان از هموستاز اپیتلیوم روده متکی هستند(۱۴). مدت‌هاست که ویتامین A به رشد طبیعی و تمایز بافت‌های اپیتلیال ضروری شناخته شده است. این ویتامین و مشتقات آن (یعنی رتینول و اسید رتینوئیک) در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز و واکنش ایمنی و بینایی نقش مهمی دارند(۳).

مطالعه حاضر نشان داد که اسید رتینوئیک پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون و با غلظت‌های افزایشی باعث کاهش در فعالیت میتوکندریایی و زنده‌مانی سلول‌های Caco-2 می‌شود. یکسری از مطالعات اشاره کرده‌اند که اسید رتینوئیک اثرات خود را از طریق گیرنده‌های اسید رتینوئیک و گیرنده‌های رتینوئیک X اعمال کرده و در مسیرهای تمایز، آپوپتوز و همچنین ایجاد توقف رشد سلول به‌صورت وابسته به غلظت در سلول‌های توموری نقش دارد(۱۵). یکی از فرضیه‌های بیان شده در مورد القای آپوپتوز در تجویز RA، کاهش سطح فاکتور هسته‌ای کاپا (NF-κB)، نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) و تولید نیتریک اکسید (NO) است که حساسیت به IFN-γ برای آپوپتوز را افزایش داده و با کاهش تنظیم فعالیت تلومراز باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود(۱۷و ۱۶).

تجدید دائمی سلول‌های اپیتلیال توسط سلول‌های بنیادی واقع در قسمت‌های پایه ولیلی‌ها در طی ۳ تا ۵ روز تکمیل می‌شود. مکانیسم‌های دقیق مولکولی حفظ این حوادث تکثیر / تمایز / آپوپتوز به‌خوبی درک نشده است. مطالعات مبتنی بر تجزیه‌وتحلیل ترانس‌کریپتوم، متابولوم و بیوانفورماتیک نقش مهمی برای HNF4α در تنظیم فنوتیپ انتروسیت پیشنهاد شده و مشخص شده است که این ژن در تمام طول محور ویلی‌های کریپت به جز قسمت پایینی ویلی بیان می‌شود(۱۹و ۱۸). در مطالعه حاضر بررسی بیان ژن HNF4α در سلول‌های Caco-2 حاکی از افزایش وابسته به غلظت در ۲۴ ساعت اول می‌باشد. به گونه‌ای که در گروه‌های غلظت بالا میزان بیان ژن بسیار چشمگیر بوده است. مطالعه Olsen و همکارانش نشان داد که بیان HNF4α در سلول‌های اپیتلیال روده Caco-2 همراه با بیان ژن آلکالن فسفاتاز روده (ALPI) بوده و این آنزیم در تمایز سلول اپیتلیال روده کوچک بیان شده(۲۰) و تنظیم‌کننده اصلی نفوذپذیری مخاط روده است(۲۱). نتایج مطالعه خاضز نشان داد تنظیم معکوس نفوذپذیری توسط RA یکی از مکانیسم‌هایی است که می‌تواند پس از گذشت ۴۸ افزایش بیان ژن αHNF_4 متعاقب تجویز RA با غلظت پایین را توجیه کند. در روز اول، کم بودن غلظت RA گروه ۱۰ میکرومول تأثیری بر روی بیان ژن نداشته؛ ولی پس از گذشت زمان تأثیر خود را به‌مانند روز اول غلظت‌های بالا در ۴۸ ساعت نشان داده است.

کمبود RA می‌تواند عملکرد مانع و میزان بیان RARβ، TLR4 و ZO-2 را در تک لایه سلول کولون کاهش دهد. استفاده با غلظت مناسب و به‌موقع RA می‌تواند عملکرد سد روده‌ای را به شکل قابل توجهی بهبود بخشد؛ اما همان‌طور که قبلاً اشاره شد، با افزایش غلظت مشتقات ویتامین A در شرایط توکسیک و افزایش مدت‌زمان قرارگیری در معرض RA، نفوذپذیری سد روده‌ایی و ارتباطات سلولی دچار اختلال شده و در نتیجه سلول‌ها با از دست دادن شرایط ایده‌آل خود به سمت آپوپتوز پیش می‌روند(۶). در روز سوم از مطالعه (۷۲ ساعت)، میزان سلول‌های زنده، باتوجه‌به نتایج MTT، کاهش چشم‌گیری داشته و در نتیجه بیان ژن $HNF_4\alpha$ به‌واسطه کاهش سلول‌های زنده به گونه‌ای که سطح بیان ژن حتی کمتر از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

بیان ژن در گروه کنترل باشد کاهش می‌یابد. گروه کنترل به‌واسطه کاهش مواد مغذی و عدم دسترسی به شرایط ایده‌آل، میزان HNF4α در این گروه نسبت به روزهای اول افزایش را نشان داده است. بر اساس مطالعه‌ایی که در زمینه بیان ژن CYP26A1، HNF4α با گیرنده‌های اسید رتینوئیک صورت گرفته، مشخص شده که ارتباط مستقیم بین آن‌ها وجود داشته و از این طریق باعث سطح بالای پاسخ به RA در بدن می‌شود(۲۲).

طبق گزارش Grenier و همکاران، درمان سلول‌های Caco-2 با RA در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف انکوباسیون باعث کاهش اختلاط تیمیدین در سلول‌ها می‌شود و نتایجی همچون کاهش و یا تعدیل سیکلین‌های نوع D با کاهش حساسیت به میتوژن سیکلین D_1 خواهد داشت. علاوه بر این، اختلال تیمیدین در روند افزایشی در p38 تاثیر داشته و باعث تحریک بیان ژن Cdx-2 می شود. Cdx-2 نوعی ژن هموباکس می‌باشد که به‌واسطه پروتئین کد شونده از آن نقش مهمی در تمایز سلول ایفا می‌کند(۲۳). نتایج مطالعه حاضر روند افزایش Cdx-2 در غلظت ۱۰ میکرومول در ۲۴ ساعت اول را نشان می‌دهد که همسو با نتایج مطالعه Grenier و همکاران می‌باشد. همچنین در این مطالعه، در ۲۴ ساعت اول و ۷۲ ساعت پس از درمان، در گروه‌های با غلظت متوسط و بالای RA، عدم افزایش Cdx-2 دیده شد. برای کاهش و یا عدم تغییرات Cdx-2 در شرایط التهابی، فرضیات مختلفی مطرح می‌شود. در کل، چنین موضوعی را می‌توان به مواردی چون وجود نقص در مسیرهای متعامل در تنظیم رونویسی Cdx-2 و یا مسیرهای مهار p38 MAPK اشاره کرد(۲۳).

کاهش چشمگیر بیان ژن Cdx-2، ۷۲ ساعت بعد از درمان با RA برخلاف گروه کنترل نشان‌دهنده، برهم خوردن هموستاز سلول‌های روده‌ای است. ثابت شده است که چندین فاکتور رونویسی آندودرمال، از جمله HNF4α و GATA6، در تنظیم Cdx-2 در روده طبیعی نقش دارند. $HNF_4\alpha$ در مکانیسم تنظیم Cdx-2 در سرطان‌های روده بزرگ نقش مهمی دارد(۲۴). کاهش تنظیم HNF4α نقش مهمی در کاهش بیان ژن سرکوبگر تومور Cdx-2 در سرطان‌های روده دارد. به صورتی که حذف این ژن، باعث کاهش پنج برابری Cdx-2 شده است. علاوه بر این از آنجایی که ازدست‌دادن عملکرد این دو ژن پیشرفت تومور را تسهیل می‌کند بیان آن‌ها عملکرد سرکوبگر توموری مشابهی را در روده بزرگ اعمال می‌کنند(۲۴-۲۶). بر اساس مطالعه دیگری که بر روی ارتباط بین دو ژن مورد بررسی در مطالعه حاضر صورت گرفته مشخص شد که پروتئین Cdx-2 از طریق مکانیسم‌های ناشناخته اپیتلیوم روده‌ای جنینی را تحت تأثیر قرار داده و با عوامل رونویسی مانند HNF4α ارتباطی مستقیم دارد. حذف ژن HNF4α تأثیری بر روی اتصال Cdx-2 یا کروماتین ندارد. در مقابل کاهش Cdx-2 به طور قابل‌توجهی بیان ژن HNF4α را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این رو، Cdx-2 کروماتین مجاز رونویسی را حفظ کرده و نقش غالب بر پیکربندی پروموتورها در بافت بزرگسالان ایفا می‌کند(۲۷).

نتیجه‌گیری

افزایش غلظت اسیدرتینوئیک در سلول‌های Caco-2 که به‌عنوان مدلی برای دستگاه گوارش و سد روده‌ایی مطرح هست، باعث آسیب به سلول و کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها در طی زمان و غلظت‌های مختلف می‌شود. همچنین باتوجه‌به نتایج مشاهده شده در این مطالعه، بین دو ژن موردمطالعه ارتباط مشخصی در روزهای اول و دوم در غلظت‌ها بالا وجود دارد که می‌توان نتیجه گرفت در صورت استفاده از مشتقات ویتامین A به‌عنوان مکمل غذایی باید توجه داشت که ممکن است به دلیل تغییرات در بیان ژن HNF4α و برهم خوردن هموستاز روده باعث افزایش نفوذ پذیری روده شده در نتیجه دستگاه گوارش مستعد بیماری‌ها التهابی و یا عفونی شود؛ ولی باتوجه‌به نتایج این مطالعه،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

استفاده از غلظت‌های بالای RA می‌تواند باعث برهم خوردن هموستاز روده به‌واسطه تغییر در ژن‌های $HNF_4\alpha$ و یا Cdx-2 شود که از نظر درمانی برای درمان سرطان‌ها مفید است؛ لذا تصمیم‌گیری در مورداستفاده از مکمل‌های ویتامین A باید با احتیاط و بسته به شرایط بیمار باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان نامه دانشجویی دکتری عمومی دامپزشکی با کد فعالیت ۳۱۷۲۱ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی استخراج گردیده است؛ لذا از حمایت معاونت پژوهش و فناوری آن دانشگاه قدردانی می‌گردد. در ضمن هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1.González-González M, Díaz-Zepeda C, Eyzaguirre-Velásquez J, González-Arancibia C, Bravo JA, Julio-Pieper M. Investigating gut permeability in animal models of disease. Front Physiol. 2019;9:1962.
2.Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Exp Mol Med. 2018;50(8):1-9.
3.Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor α agonists in colitis. Mol Pharmacol. 2007;71(1):250-58.
4.Amit-Romach E, Uni Z, Cheled S, Berkovich Z, Reifen R. Bacterial population and innate immunity-related genes in rat gastrointestinal tract are altered by vitamin A-deficient diet. J Nutr Biochem. 2009;20(1):70-77.
5.Lima AA, Soares AM, Lima NL, Mota RM, Maciel BL, Kvalsund MP, Barrett LJ, et al. Vitamin A supplementation effects on intestinal barrier function, growth, total parasitic and specific Giardia spp. infections in Brazilian children: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;50(3):309.
6.Li Y, Gao Y, Cui T, Yang T, Liu L, Li T, et al. Retinoic acid facilitates toll-like receptor 4 expression to improve intestinal barrier function through retinoic acid receptor beta. Cell Physiol Biochem. 2017;42(4):1390-406.
7.Xu C, Ooi WF, Qamra A, Tan J, Chua BY, Ho SW, et al. HNF4α pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer. Gut. 2020;69(2):231-42.
8.Shi Y, Zhou D, Wang B, Zhou D, Shi B. Roles and mechanisms of action of HNF- 4α in the hepatic differentiation of WB- F344 cells. Int J Mol Med. 2019;43(2):1021-32.
9.Garrison WD, Battle MA, Yang C, Kaestner KH, Sladek FM, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4α is essential for embryonic development of the mouse colon. Gastroenterology. 2006;130(4):19-e1.
10.Darsigny M, Babeu JP, Dupuis AA, Furth EE, Seidman EG, Lévy É, et al. Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4α affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. PloS One. 2009;4(10):e7609.
11.Boyd M, Bressendorff S, Møller J, Olsen J, Troelsen JT. Mapping of HNF4α target genes in intestinal epithelial cells. BMC Gastroenterol. 2009;9(1):1-6.
12.Saad RS, Ghorab Z, Khalifa MA, Xu M. CDX2 as a marker for intestinal differentiation: Its utility and limitations. World J Gastrointest Surg. 2011;3(11):159.
13.Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol Toxicol. 2005;21(1):1-26.
14.Nalle SC, Turner JR. Intestinal barrier loss as a critical pathogenic link between inflammatory bowel disease and graft-versus-host disease. Mucosal Immunol. 2015;8(4):720-30.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]

15.Chang Q, Chen Z, You J, McNutt MA, Zhang T, Han Z, et al. All-trans-retinoic acid induces cell growth arrest in a human medulloblastoma cell line. J Neurooncol. 2007;84(3):263-67.
16.Das A, Banik NL, Ray SK. Molecular mechanisms of the combination of retinoid and interferon-gamma for inducing differentiation and increasing apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. Neurochem Res. 2009;34(1):87-101.
17.Briviba K, Schnäbele K, Schwertle E, Blockhaus M, Rechkemmer G. β-Carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. Biol Chem. 2001; 382(12):1663-68.
18.Li X, Madison BB, Zacharias W, Kolterud A, States D, Gumucio DL. Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. Physiol Genomics. 2007;29(3):290-301.
19.Stegmann A, Hansen M, Wang Y, Larsen JB, Lund LR, Ritié L, et al. Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. Physiol Genomics. 2006;27(2):141-55.
20.Olsen L, Bressendorff S, Troelsen JT, Olsen J. Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005;289(2):G220-26.
21.Liu W, Hu D, Huo H, Zhang W, Adiliaghdam F, Morrison S, et al. Intestinal alkaline phosphatase regulates tight junction protein levels. J Am Coll Surg. 2016;222(6):1009-17.
22.Stevison F, Hogarth C, Tripathy S, Kent T, Isoherranen N. Inhibition of the all-trans retinoic acid (atRA) hydroxylases CYP26A1 and CYP26B1 results in dynamic, tissue-specific changes in endogenous atRA signaling. Drug Metab Dispos. 2017;45(7):846-54.
23.Grenier E, Maupas FS, Beaulieu J-F, Seidman E, Delvin E, Sane A, et al. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. Am J Physiol Gastrointest. 2007;293(6):G1178-G89.
24.Benahmed F, Gross I, Gaunt SJ, Beck F, Jehan F, Domon–Dell C, et al. Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. Gastroenterology. 2008;135(4):1238-47. e3.
25.Larsen S, Davidsen J, Dahlgaard K, Pedersen OB, Troelsen JTJIjoms. HNF4α and CDX2 regulate intestinal YAP1 promoter activity. Int J Mol Sci. 2019;20(12):2981.
26.Saandi T, Baraille F, Derbal-Wolfrom L, Cattin A, Benahmed F, Martin E, et al. Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4α in intestinal cancer. Oncogene. 2013;32(32):3782-88.
27.Verzi MP, Shin H, San Roman AK, Liu XS, Shivdasani RAJM. Intestinal master transcription factor CDX2 controls chromatin access for partner transcription factor binding. Mol Cell Biol. 2013;33(2):281-92.
28.Girard R, Darsigny M, Jones C, Maloum-Rami F, Gélinas Y, Carpentier AC, et al. HNF4α is a novel regulator of intestinal glucose-dependent insulinotropic polypeptide. Sci Rep. 2019;9(1):1-11.
29.Zheng J, He S, Qi J, Wang X, Yu J, Wu Y, et al. Targeted CDX2 expression inhibits aggressive phenotypes of colon cancer cells in vitro and in vivo. Int J Oncol. 2017;51(2):478-88.
30.Park H-Y, Kunitake Y, Hirasaki N, Tanaka M, Matsui T. Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. Biosci Biotechnol Biochem. 2015;79(1):130-7.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-06-29]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.1]