



Original Article

Bioinformatics Study of the Role of LncRNA-SLC7A11-AS1 in the Progression of Hepatocellular Carcinoma through the Suppression of Ferroptosis

Maliheh Safarioun¹, Homa Mollaei^{2*}

¹ Education Organization of South Khorasan, Birjand, Iran.

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran

Received: 2024/10/05

Accepted: 2024/11/03

Online Published: 2024/11/10

Abstract

Hepatocellular carcinoma is the most common form of liver cancer, accounting for about 90% of cases. The rising statistics of this cancer clearly highlight the importance of better understanding the mechanisms of pathogenesis and identifying new therapeutic targets. Nowadays, iron-dependent programmed cell death (ferroptosis) has extended significant attention. Long non-coding RNAs (lncRNAs), key regulators of ferroptosis, play critical roles in various cellular processes, including pathways involved in carcinogenesis, by modulating the expression of downstream genes. In the present study, by analysis the bioinformatics data recorded in the GEO database related to RNA-seq analysis, we investigated the differentially expressed genes resulting from the suppression of LncRNA SLC7A11 in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. The results indicated that the main differentially expressed genes in this study were involved in the ferroptosis mechanisms, contributing to cancer progression. Consequently, this LncRNA could be considered an important therapeutic target for future laboratory investigation.

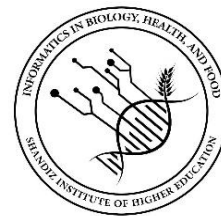
Keywords: Bioinformatics, LncRNA, Hepatocellular carcinoma, Ferroptosis.

Cite this article: Safarioun M, Mollaei H. Bioinformatics study of the role of LncRNA-SLC7A11-AS1 in the progression of hepatocellular carcinoma through the suppression of ferroptosis. *InformatICS in Biology, Health, and Food*. 2024;1(1):19-25.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education.

Corresponding author: Homa Mollaei

Email: Hmollaei@birjand.ac.ir



مطالعه بیوانفورماتیکی ارتباط بین سرکوب LncRNA-SLC7A11-AS1 و تغییر بیان ژن‌های درگیر در مسیر فروپتوز در رده سلولی هپاتوسلولار کارسینوما

ملیحه صفاریون^۱، هما ملایی^{۲*}

^۱ سازمان آموزش و پرورش خراسان جنوبی، بیرجند، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۱۴ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۸/۲۰

چکیده

هپاتوسلولار کارسینوما شایع‌ترین فرم سرطان کبد است که حدود ۹۰ درصد موارد ابتلا را شامل می‌شود. آمار رو به رشد این سرطان، اهمیت درک بهتر مکانیسم‌های بیماری‌زایی و شناسایی اهداف درمانی جدید را به روشنی نشان می‌دهد. امروزه مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده وابسته به آهن (فروپتوز) در این خصوص بسیار مورد توجه قرار گرفته است. یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم فروپتوز، RNAs غیر کدکننده طویل (LncRNA) هستند که با تنظیم سطح بیان ژن‌های پایین دست خود، در بسیاری از روندهای سلولی از جمله مسیرهای مرتبط با سرطان‌زایی نقش دارند. در مطالعه حاضر با بررسی بیوانفورماتیکی داده‌های ثبت شده در پایگاه داده GEO، مربوط به آنالیز RNA-seq، به بررسی ژن‌های تغییر بیان یافته در نتیجه سرکوب داده‌های LncRNA-SLC7A11 در رده سلولی سرطانی انسانی هپاتوسلولار کارسینوما (HepG²) پرداخته شد. نتایج حاصل نشان داد اصلی‌ترین ژن‌های تغییر بیان یافته در این مطالعه در مکانیسم فروپتوز درگیر هستند و از این طریق در پیشرفت سرطان دخالت می‌کنند. در نتیجه این LncRNA می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی مهم در مطالعات آزمایشگاهی آینده مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیوانفورماتیک، LncRNA، هپاتوسلولار کارسینوما، فروپتوز

Cite this article: Safarioun M, Mollaei H. Bioinformatics study of the role of LncRNA-SLC7A11-AS1 in the progression of hepatocellular carcinoma through the suppression of ferroptosis. *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2024;1(1):19-25.

Copyright©: The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

Corresponding author: Homa Mollaei

Email: Hmollaei@birjand.ac.ir

مقدمه

زیادی ژن‌ها را هدف قرار دهد (۷). از جمله این ژن‌ها، ژن‌های تنظیم کننده کبدی گلوکز و لیپید مانند IGFBP1^۱ می‌باشند. مطالعات نشان داده‌اند که هیپاتوسیت‌ها، IGFBP1 را ترشح می‌کنند و ترشح آن با انسولین مهار می‌شود (۸). علاوه بر این تعداد دیگری از تنظیم کننده‌های مسیر فروپتوز نیز تاکنون شناخته شده‌اند.

SERPINA3 یکی از این تنظیم کننده‌ها می‌باشد که اختلال در بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها دیده شده است. این پروتئین در ارتباط با بیوسنتز اسیدهای آمینه از جمله سیستئین و گلوتامات و نیز مسیرهای بیوسنتز کربوهیدرات‌ها و لیپیدها می‌باشد (۹). EPHA2 نیز عضوی از خانواده Eph با فعالیت تیروزین کینازی است که در تنظیم مسیرهای پیام رسانی مرتبط با بدخیمی‌ها از جمله فروپتوز نقش دارد (۱۰).

در این مطالعه بیوانفورماتیک، با استفاده از پایگاه داده GEO^۴ (Gene Expression Omnibus)، داده‌های مربوط به RNA-seq مطالعه GSE-۲۴۴۷۶۲ مورد بررسی قرار گرفته و با آنالیز داده‌ها توسط GEO2R ارتباط بین سرکوب LncRNA-SLC7A11-AS1 و تغییر سطح بیان ژن‌های درگیر در مسیر فروپتوز در هیپاتوسلولار کارسینوما ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری داده‌ها

به منظور انجام مطالعه بیوانفورماتیکی، ابتدا داده‌های بیانی چندین هزار ژن که توسط فناوری RNA-seq تهیه شده بودند، از بانک داده‌های GEO پایگاه داده NCBI با کد دسترسی GSE-۲۴۴۷۶۲ جمع آوری شد. این آنالیز در سال ۲۰۲۴ توسط Yuan و همکاران انجام شده و نتایج آن ثبت گردیده است. در این پژوهش، برای بررسی نقش Lnc-RNA SLC7A11 در کارسینوما کبد، این Lnc-RNA در رده سلولی سرطانی انسانی هیپاتوسلولار کارسینوما (HepG2) توسط فناوری shRNA سرکوب شده است (۱۱). RNA کوتاه سنجاق سری یا Short Hairpin RNA، یک مولکول RNA آزمایشگاهی با یک پیچ

سرطان کبد از جمله شایع‌ترین بدخیمی‌ها در سراسر جهان است. اغلب بیماران مبتلا به سرطان کبد در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند که به پیش آگهی ضعیف آن منجر می‌شود. از همه موارد سرطان کبد، بیش از ۹۰ درصد آن، هیپاتوسلولار کارسینوما^۱ (HCCs) می‌باشد (۱). اولین مرحله در ایجاد این سرطان همچون سایر انواع سرطان‌ها، تغییر بیان ژن‌ها است که منجر به اختلال در مسیرهای سلولی مرتبط شده و بیماری را به وجود می‌آورد. فروپتوز از جمله این مکانیسم‌هایی است که نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده وابسته به آهن می‌باشد. فروپتوز از نظر بیوشیمیایی، ریخت‌شناسی و ژنتیکی ویژگی‌های منحصر به فرد خود را دارد و از سایر مرگ‌های سلولی متمایز است. بازیگران اصلی و محرک فروپتوز، سیستم سیستئین/گلوتامات و آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPX4) هستند (۲، ۳). همچنین از جمله تنظیم کننده‌های مهم این مسیر که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند، LncRNA^۲ ها هستند (۴، ۵).

LncRNAها، رونوشت‌های مشابه mRNA می‌باشند که اندازه‌ی آنها بین ۲۰۰ تا ۱۰۰ کیلوباز متغیر است و فاقد توانایی کد کردن پروتئین هستند. LncRNAها در فرایندهای مختلف سلولی و مولکولی و تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند (۶). این سیستم از یک زیرواحد عملکردی به نام SLC7A11 و یک زیرواحد نظارتی به نام SLC3A2 تشکیل شده است به طوری که خلاصه وظیفه این سیستم نقل و انتقال معکوس سیستئین و گلوتامات است. با ورود سیستئین به سلول تولید گلوکاتایون می‌رود که به نوبه خود باعث افزایش کارکرد آنزیم GPX4 می‌شود. GPX4 آنزیم اصلی محافظت در برابر آسیب به سلول ناشی از پراکسیداسیون شدید لیپیدی است. در صورتی که در ژن زیر واحدهای این سیستم اختلال ایجاد شود، آنزیم درست عمل نمی‌کند، در نتیجه جمع شدن سریع پراکسیدهای لیپیدی باعث القای فروپتوز و تغییر به سمت کبد چرب پیشرفته و سپس سرطان کبد می‌شود (۴). مسیر پیام رسانی Mitogen-activated protein kinase (MAPK) نیز به عنوان تنظیم کننده استرس اکسیداتیو در فرایند فروپتوز نقش مهمی دارد. این مسیر خود توسط گروهی از تنظیم کننده‌های بالادست کنترل شده و است که می‌تواند تعداد

¹ Hepatocellular Carcinoma

² Long non-coding RNA

³ Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1

سجاق‌سری است که می‌تواند جهت خاموش کردن یا سرکوب بیان ژن هدف از طریق فرایند تداخل RNAi وارد

عمل شود.

آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌ها:

ابتدا پیش پردازش‌های لازم شامل مشخص کردن نمونه‌های تست و کنترل، تعیین تست آماری و pvalue بر روی داده‌های استخراج شده از GSE-۲۴۴۷۶۲ انجام شده و سپس داده‌ها جهت تعیین بیشترین و کمترین تغییرات بیانی مشاهده شده، توسط GEO2R مورد آنالیز قرار گرفتند. به این منظور، ۳ نمونه تست (سلول‌های تیمار شده با shRNA سرکوب کننده LncRNA-SLC7A11-AS1) و ۲ نمونه کنترل (سلول‌های بدون تیمار با shRNA) با هم مقایسه شدند و نتایج با pvalue برابر ۰/۰۵ گزارش گردید.

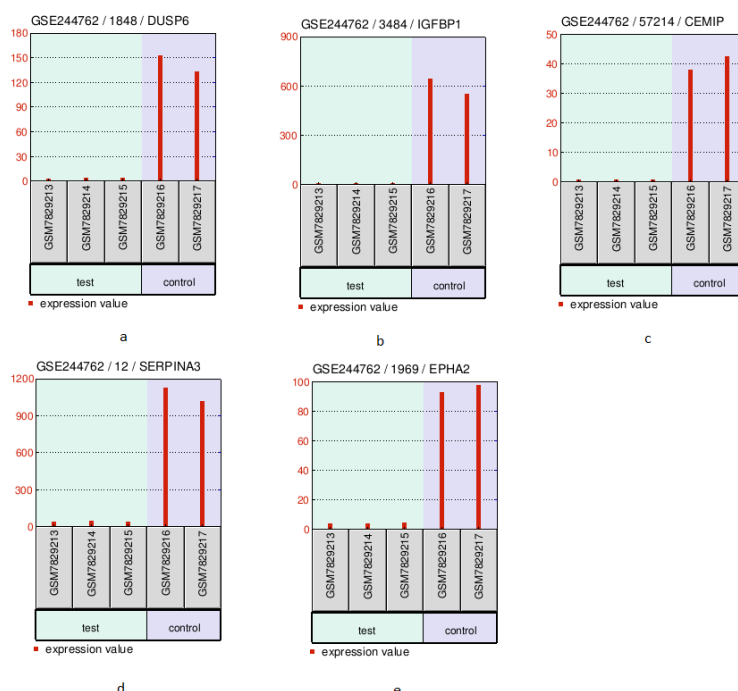
آنجا که نقش فروپتوز در فرایندهای سرطان زایی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، شناسایی این ژن‌ها می‌تواند در درک بهتر بیماری و ارائه راهکارهای درمانی هدفمند موثر باشد. در ادامه به ۱۰ مورد از ژن‌هایی که بیشترین میزان کاهش و افزایش بیان را داشته اند اشاره شده است.

ژن‌های کاهش بیان یافته

بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز GEO2R، پس از سرکوب LncRNA SLC7A11 توسط shRNA، گروه زیادی از ژن‌های پایین دست کاهش بیان یافتند که بیشترین کاهش بیان، به ترتیب مربوط به ژن‌های dual specificity phosphatase 6 (DUSP6)، insulin like growth factor 1 binding protein 1 (IGFBP1)، hyaluronidase 1 (CEMP1)، EPH receptor A2 (EPHA2) می‌باشد.

نتایج:

نتایج آنالیز داده‌ها با GEO2R نشان داد، سرکوب LncRNA SLC7A11، در رده سلولی سرطانی هیپاتوسلولار کارسینوما انسانی (HepG2) با استفاده از فناوری shRNA می‌تواند منجر به تغییر سطح بیان تعداد زیادی از ژن‌های پایین دست شود که گروه مهمی از آن‌ها در فرآیند فروپتوز نقش دارند. از



شکل ۱. نمودار کاهش بیان ژن‌ها در نمونه‌های تست نسبت به نمونه‌های کنترل.

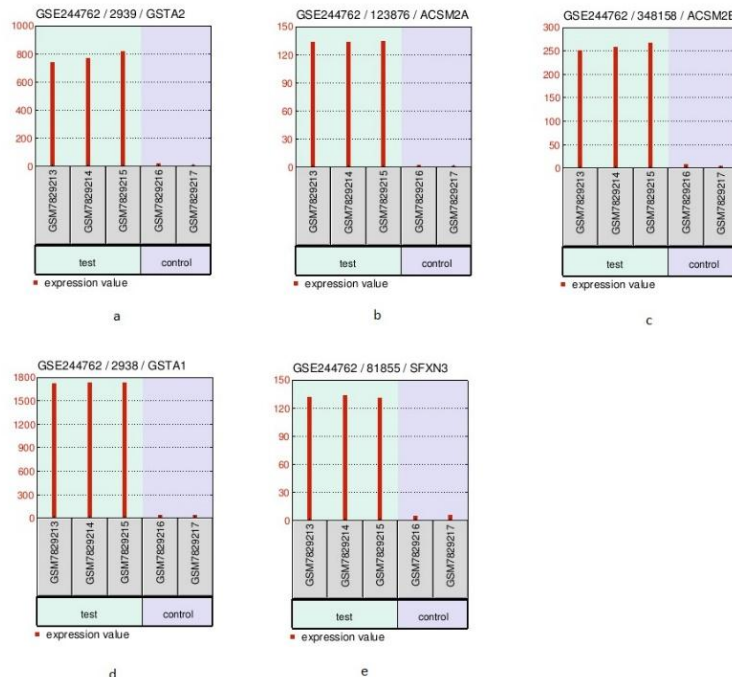
Figure 1: The chart of gene expression downregulation in test samples compared to control samples.

ژن‌های افزایش بیان یافته

بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز GEO2R، پس از سرکوب *SLC7A11* LncRNA توسط shRNA، گروه زیادی از ژن‌های پایین دست، افزایش بیان یافتند. بیشترین افزایش بیان به ترتیب مربوط به ژن‌های glutathione S-transferase alpha 2 (GSTA2)، acyl-CoA synthetase medium chain family member 2A

(ACSM2A)، acyl-CoA synthetase medium chain family member 2B (ACSM2B)، glutathione S-transferase alpha 1 (GSTA1)، sideroflexin 3 (SFXN3)

می باشد که نمودار مربوط به هر مورد در شکل ۲ (a-e) نشان داده شده است.



شکل ۲: نمودار افزایش بیان ژن‌ها در نمونه‌های تست نسبت به نمونه‌های کنترل.

Figure 2: The chart of over gene expression in test samples compared to control samples.

بحث

تجمع چربی و پیشبرد فروپتوز و کبد چرب نیز نقش دارد (۸). هم چنین مطالعات نشان داده‌اند که CEMIP به عنوان یک پروتئین القا کننده مهاجرت سلولی، در حفظ سلول‌های جدا شده از ماتریکس خارج سلولی و متاستاز آن‌ها نقش دارد. علاوه بر این نشان داده شده است که این سلول‌ها با القای فروپتوز در سلول‌های سرطانی نیز مرتبط هستند اما مکانیسم دقیق مولکولی آن هنوز ناشناخته است (۱۳). SERPINA3 نیز که در پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها نقش داشته با انواع مرگ سلولی برنامه ریزی شده از جمله فروپتوز در ارتباط می‌باشد (۹). EPHA2 نیز به عنوان یک تنظیم کننده مهم، با بیان ژن‌های

نتایج به دست آمده از، این آنالیز بیانگر ارتباط مؤثر *LncRNA-SLC7A11-AS1* با ژن‌های درگیر در مسیر فروپتوز بود.

خانواده ژنی DUSP6 تنظیم کننده‌های مهم مسیر پیام رسانی MAPK هستند که در تغییر در سطح بیان آن‌ها در بسیاری از بیماری‌ها از جمله انواع سرطان‌ها دیده می‌شود. مطالعات نشان داده است که DUSP6 از طریق سرکوب مسیر MAPK نیز موجب کاهش فروپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد (۱۲).

IGFBP1 نیز به عنوان تنظیم کننده گلوکز شناخته شده که به عنوان یکی از اهداف مسیر پیام رسانی MAPK در کنترل

مشخصی وجود دارد که مربوط به نقش مهم میتوکندری در متابولیسم آهن می‌باشد. به عنوان مثال گزارش شده است که سرکوب ژن SFXN4 منجر به القای فروپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۶).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده نقش بسیار مهم LncRNA-SLC7A11، به عنوان یک تنظیم کننده بالادست در فرایند فروپتوز می‌باشد. از آنجا که ارتباط بین فروپتوز و پیشرفت سرطان امروزه بسیار مورد توجه است، شناسایی این ارتباطات مولکولی می‌تواند در درک بهتر مکانیسم‌ها و ارائه راهکارهای درمانی مؤثرتر مفید باشد. با این وجود بررسی‌های آزمایشگاهی این ارتباطات جهت تایید یافته‌های آنالیزهای بیوانفورماتیکی ضروری به نظر می‌رسد.

فروپتوزی در سرطان‌ها ارتباط مستقیم دارد (۱۰). GST ها از جمله کوفاکتورهای مهم GPX4 هستند که به عنوان یکی از اصلی‌ترین بازیگران فروپتوز به حساب می‌آید و در محافظت از سلول‌ها در برابر پراکسیداسیون شدید لیپیدی نقش مهمی دارد (۱۴).

ACSM ها، عضوی از خانواده استیل کوآنزیم A سنتتاز با زنجیره متوسط هستند. آنزیم‌های این خانواده در واکنش‌های بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب، آسیلاسیون پروتئین‌ها و سنتز لیپیدها نقش دارند. عدم تنظیم صحیح این آنزیم‌ها در بسیاری از سرطان‌ها و در ارتباط با فروپتوز گزارش شده است. هم چنین مشخص شده است که کاهش کوآنزیم آ (COA) نیز به عنوان یکی از کوفاکتورهای سرکوبگر فروپتوز (FSP1) در سرکوب فروپتوز تأثیرگذار است (۱۵). SFXN3 به عنوان ناقل میتوکندریایی سرین عمل می‌کند.

مطالعات نشان داده بین سیدروفلوکسین و فروپتوز ارتباط

References

- Mak L-Y, Liu K, Chirapongsathorn S, Yew KC, Tamaki N, Rajaram RB, et al. Liver diseases and hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region: burden, trends, challenges and future directions. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2024;1-18. doi: 10.1038/s41575-024-00967-4.
- Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2024;1-19. doi: 10.1038/s41580-024-00703-5.
- Zhou Q, Meng Y, Li D, Yao L, Le J, Liu Y, et al. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024;9(1):55. doi: 10.1038/s41392-024-01769-5.
- Qu L, He X, Tang Q, Fan X, Liu J, Lin A. Iron metabolism, ferroptosis, and lncRNA in cancer: knowns and unknowns. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2022;23(10):844-62. doi: 10.1631/jzus.B2200194.
- Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Basic biology and therapeutic implications of lncRNA. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:15-24. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.012
- Yang G, Lu X, Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2014;1839(11):1097-109. doi:10.1016/j.bbagr.2014.08.012.
- Wang X, Tan X, Zhang J, Wu J, Shi H. The emerging roles of MAPK-AMPK in ferroptosis regulatory network. *Cell Communication and*

- Signaling*. 2023;21(1):200. doi: 10.1186/s12964-023-01170-9.
- Zhu J, Guo J, Liu Z, Liu J, Yuan A, Chen H, et al. Salvianolic acid A attenuates non-alcoholic fatty liver disease by regulating the AMPK-IGFBP1 pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 2024;400:111162. doi: 10.1016/j.cbi.2024.111162
- Xia G, Wu S, Luo K, Cui X. By using machine learning and in vitro testing, SERPINH1 functions as a novel tumorigenic and immunogenic gene and predicts immunotherapy response in osteosarcoma. *Frontiers in Oncology*. 2023;13:1180191. doi: 10.3389/fonc.2023.1180191
- Li Y, Peng Q, Wang L. EphA2 as a phase separation protein associated with ferroptosis and immune cell infiltration in colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2023;11;15(22):12952. doi: 10.18632/aging.205212
- Yuan X, Wang Y, Jiao S, Gao H, Zhang M, Wang X, et al. Identification of SLC7A11-AS1/SLC7A11 pair as a ferroptosis-related therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2024;28(13):e18496. doi: 10.1111/jcmm.18496.
- Xie Y, Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R. DUSP1 blocks autophagy-dependent ferroptosis in pancreatic cancer. *Journal of Pancreatology*. 2020;3(3):154-60. doi:10.1097/JP9.0000000000000054
- Liu B, Li X, Wang D, Yu Y, Lu D, Chen L, et al. CEMIP promotes extracellular matrix-detached prostate cancer cell survival by inhibiting ferroptosis. *Cancer Science*. 2022;113(6):2056-70.

doi: 10.1111/cas.15356.

14. Shi Y, Xu N, Liu B, Ma Y, Fu X, Shang Y, et al. Mifepristone protects acetaminophen induced liver injury through NRF2/GSH/GST mediated ferroptosis suppression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2024.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.06.014.

15. Shrestha R, Nassar ZD, Hanson AR, Iggo R, Townley SL, Dehairs J, et al. ACSM1 and ACSM3 regulate prostate cancer fatty acid metabolism to

promote tumour growth and constrain ferroptosis. *Cancer Research*. 2024 Jul 15;84(14):2313-3. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-1489.

16. Tifoun N, De las Heras JM, Guillaume A, Bouleau S, Mignotte B, Le Floch N. Insights into the roles of the sideroflexins/SLC56 family in iron homeostasis and iron-sulfur biogenesis.

Biomedicines.2021;9(2):103

.doi:10.3390/biomedicines9020103.