Pars Journal of Medical Sciences
Pars J Med Sci 2026;24(1):44-55
https:// jmj.jums.ac.ir

Original Article

Expression and Correlation Analysis of miR-193b-5p with CLTC and AP2M1 in NASH-Associated Hepatocellular Carcinoma

Fatemeh Esmaeilzadeh[1], Farshid Kafilzadeh[1], Noosha Zia Jahromi[2], Leila Kohan[3], Samaneh Zolghadri[1,*]

Received: 20.04.2026 Revised: 10.06.2026 Accepted: 14.06.2026

1. Department of Biology, Ja.C., Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2. Department of Biology, Shk.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Department of Biology, Ars.C., Islamic Azad University, Arsanjan, Iran

DOI:10.22034/pjms.2026.2090472.1290

Abstract

Introduction: It is predicted that over 30% of adults will be affected by non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), with approximately 20% of these cases progressing to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Due to these trends, cases of hepatocellular carcinoma (HCC) and NASH-related liver transplants are expected to double by 2030. The development of targeted therapies requires an understanding of the genetic and regulatory mechanisms involving non-coding RNAs (ncRNAs) in NASH. The aim of the present study was expression and correlation analysis of miR-193b-5p with CLTC and AP2M1 in NASH-associated hepatocellular carcinoma.

Methods and Materials: We investigated the regulatory interaction between CLTC, AP2M1, and miR-193b-5p through comprehensive bioinformatics (in silico) analyses and then validated it experimentally using molecular methods, including qRT-PCR.

Results: qRT-PCR data demonstrated that miR-193b-5p expression was significantly decreased in HCC patients compared to the control group. Furthermore, correlation analysis revealed a negative correlation between miR-193b-5p and CLTC and AP2M1 genes.

Conclusion: miR-193b-5p was identified as a miRNA with consistently reduced expression in liver cancer (LIHC), suggesting its potential regulatory role in the progression of liver diseases. Integrated bioinformatics analyses showed that CLTC and AP2M1 genes, which are inversely correlated with miR-193b-5p, are enriched in pathways related to lipid metabolism, vesicle-mediated transport, endocytosis, and survival-related signaling pathways- pathways closely associated with NASH progression and liver carcinogenesis.

Keywords: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatocellular Carcinoma, CLTC, AP2M1, miR-193b-5p

* Corresponding author: Samaneh Zolghadri. Department of Biology, Ja.C., Islamic Azad University, Jahrom, Iran. Email: szjahromi@iau.ac.ir

Copyright © 2026 The Authors. Published by Jahrom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مجله علوم پزشکی پارس
دوره بیست و چهارم، شماره یک، بهار۱۴۰۵، صفحات: ۵۵-۴۴
https:// jmj.jums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تحلیل بیان و همبستگی miR-193b-5p با ژن‌های CLTC و AP2M1 در کارسینوم هپاتوسلولار مرتبط با استئاتوهپاتیت غیرالکلی

فاطمه اسماعیل‌زاده[۱]، فرشید کفیل‌زاده[۱]، نوشا ضیا جهرمی[۲]، لیلا کهن[۳]، سمانه ذوالقدری[۱*]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۳-گروه زیست‌شناسی، واحد ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، ارسنجان، ایران

DOI: 10.22034/pjms.2026.2090472.1290

چکیده

مقدمه: بر اساس پیش‌بینی‌ها، بیش از ۳۰ درصد بزرگسالان به بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) مبتلا خواهند بود و حدود ۲۰ درصد از این موارد به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) پیشرفت خواهند کرد. همچنین انتظار می‌رود به دلیل این روندها، موارد کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) و پیوند کبد مرتبط با NASH تا سال ۲۰۳۰ دو برابر شود. توسعه درمان‌های هدفمند نیازمند درک مکانیسم‌های ژنتیکی و تنظیمی وابسته به RNA های غیرکدکننده (ncRNA) در NASH است. هدف مطالعه حاضر تحلیل بیان و همبستگی miR-193b-5p با ژن‌های CLTC و AP2M1 در کارسینوم هپاتوسلولار مرتبط با استئاتوهپاتیت غیرالکلی بود.

روش‌کار: برهم‌کنش تنظیمی بین miR-193b-5p و ژن‌های هدف آن CLTC و AP2M1 با استفاده از داده‌های سرطان کبد در پایگاه‌های TCGA و UALCAN و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی شامل edgeR، limma، PCA، STRING و Enrichr بررسی شد. سپس بیان miR-193b-5p ، CLTC و AP2M1 در ۲۵ بیمار مبتلا به HCC و ۲۵ فرد سالم با استفاده از qRT-PCR ارزیابی و اختلاف بیان با آزمون‌های آماری مناسب در GraphPad Prism 8 تحلیل شد.

یافته‌ها: داده‌های qRT-PCR نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، میزان بیان miR-193b-5p در بیماران مبتلا به HCC به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین، تحلیل همبستگی نشان داد که miR-193b-5p با ژن‌های CLTC و AP2M1، همبستگی منفی دارد.

نتیجه گیری: miR-193b-5p به‌عنوان یک miRNA با کاهش بیان معنی‌دار در سرطان کبد (LIHC) شناسایی شد که می‌تواند در پاتوژنز این بیماری نقش داشته باشد. تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان دادند که ژن‌های CLTC و AP2M1 دارای ارتباط معکوس با miR-193b-5p هستند و در سرطان کبد افزایش بیان یافته‌اند. همچنین، این ژن‌ها در مسیرهای زیستی مرتبط با متابولیسم لیپید، انتقال وابسته به وزیکول و اندوسیتوز غنی‌سازی شدند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که محور تنظیمی miR-193b-5p/CLTC/AP2M1 ممکن است در پیشرفت NASH و سرطان‌زایی کبدی نقش داشته باشد و به‌عنوان یک هدف بالقوه برای مطالعات آینده مطرح شود.

واژگان کلیدی: کبد چرب غیرالکلی، کارسینوم هپاتوسلولار، CLTC، AP2M1، miR-193b-5p

* نویسنده مسئول: سمانه ذوالقدری. گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
تلفن تماس: ۰۹۱۷۷۹۱۶۵۳۸ پست الکترونیک: Szjahromi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۳۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۴

مقدمه

حدود ۲۵ درصد از جمعیت جهان به بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) مبتلا هستند. استئاتوز به تجمع بیش از حد چربی در کبد افرادی گفته می‌شود که الکل بسیار کم یا اصلاً مصرف نمی‌کنند و یکی از نشانه‌های بیماری کبد چرب غیرالکلی است. حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد مواردNAFLD شامل استئاتوز ساده هستند که معمولاً یک وضعیت خوش‌خیم بوده و در طول زمان پیشرفت نمی‌کند. با این حال، ۱۰ تا ۲۰ درصد موارد NAFLD به استئاتوهپاتیت غیرالکلی (NASH) تبدیل می‌شوند (۱).

اگرچه NASH اغلب به‌عنوان یک بیماری بدون علامت شناخته می‌شود، اما معمولاً با علایمی مبهم مانند درد قسمت فوقانی راست شکم یا خستگی همراه است که می‌تواند باعث پیشرفت پنهان بیماری شود. پیش‌بینی می‌شود حدود یک‌سوم بیماران مبتلا به NAFLD به NASH مبتلا شوند (۲).

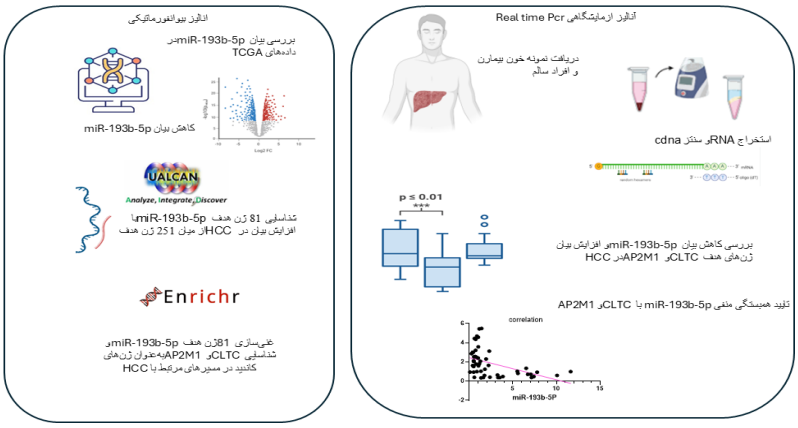
حدود ۲۰ درصد بیماران مبتلا به NASH دچار فیبروز پیشرفته، شامل سیروز و فیبروز پل‌زننده، می‌شوند (۳). فیبروز پیشرفته می‌تواند به بیماری مرحله نهایی کبد، کارسینوم هپاتوسلولار (HCC)، نیاز به پیوند کبد و در نهایت افزایش میزان مرگ‌ومیر منجر شود (۴). انتقال از NAFLDبه NASH فرایندی پیچیده و چندعاملی است (۵). چاقی، دیابت و فشار خون بالا از مهم‌ترین عوامل خطر مؤثر در این پیشرفت هستند (۴). تعامل میان این اختلالات، زمینه‌های ژنتیکی و عوامل محیطی در ایجاد NASH نقش دارد.

شروع و پیشرفت NASH به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر تغییرات بیان ژنی قرار دارد. این تغییرات می‌توانند مسیرهای سلولی و فعالیت آنزیمی را مختل کرده و منجر به تجمع بیشتر چربی در کبد و آسیب سلول‌های کبدی شوند. علاوه بر این، تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با عملکردهای کبدی مانند سم‌زدایی و متابولیسم لیپید نیز ممکن است در ایجاد این بیماری نقش مهمی داشته باشد (۶). RNAهای غیرکدکننده (ncRNAs)نقش مهمی در تنظیم بیان ژن در NASH دارند. میکروRNAها (miRNAs) نوعی ncRNA هستند که با اتصال به ناحیه ۳'UTR mRNAهای هدف، از طریق مهار ترجمه یا تخریب mRNA، بیان ژن را در سطح پسارونویسی تنظیم می‌کنند (۷، ۸). این تنظیم بر بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی و فرایندهای سلولی مرتبط با التهاب، فیبروز و متابولیسم لیپید تأثیر می‌گذارد (۹).

مطالعات بیوانفورماتیکی نقش مهمی در شناسایی miRNAها و mRNAهای مرتبط با بیماری‌هایی مانند NASH داشته‌اند (۱۰، ۱۱). از جمله miR-193b-5p در مطالعات قبلی نشان داده شده است که تغییرات بیان معنی داری در بیماری مرتبط با Nash داشته است (۱۱). علاوه بر این، داده‌های موجود در پروژه اطلس ژنوم سرطان (TCGA) امکان درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی عملکرد ncRNAها و شبکه‌های تنظیمی آن‌ها را فراهم می‌کند. این منابع می‌توانند روند توسعه ابزارهای تشخیصی جدید و شناسایی اهداف درمانی برای NASH را تسریع کنند.

برای درک فرایندهای تنظیمی زمینه‌ساز NASH، شناخت ارتباط مستقیم میان mRNAها و miRNAها ضروری است. این تعاملات برای درک نحوه تنظیم بیان ژن در کبد و چگونگی نقش اختلال در این تنظیم در پیشرفت بیماری اهمیت زیادی دارند (۱۲).

شواهد حاصل از مطالعات پیشین نشان داده‌اند که miR-193b-5p در تنظیم فرایندهای مهم مرتبط با سرطان کبد، از جمله تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلولی، نقش دارد. مطالعات تجربی همچنین نشان داده‌اند که miR-193b-5p از طریق تعامل با شبکه‌های تنظیمی مختلف می‌تواند در پیشرفت HCC مشارکت داشته باشد. علاوه بر این، شواهد اخیر نشان‌دهنده ارتباط miR-193b-5p با اختلالات متابولیک و فرایندهای مرتبط با NASH است (۱۳–۱۶). با توجه به شواهد مطالعات پیشین مبنی بر نقش miR-193b-5p در تنظیم مسیرهای مولکولی مرتبط با سرطان و اهمیت بالقوه آن در پاتولوژی کبد، به‌عنوان یک miRNAکاندید برای بررسی بیشتر در مطالعه حاضر انتخاب شد. در مطالعه حاضر علاوه بر تحلیل داده‌های موجود، قصد بر این بود که میزان بیان miR-193b-5p در داده‌های TCGA نیز بررسی شود تا الگوی بیان آن در سرطان کبد (LIHC) به‌صورت جامع‌تر ارزیابی گردد. همچنین ژن‌های هدف این miRNA و ارتباط آن‌ها با مسیرهای بیانی و تنظیمی مرتبط با بیماری، از طریق تحلیل‌های همبستگی و غنی‌سازی عملکردی مورد بررسی قرار گرفت تا نقش تنظیمی miR-193b-5pدر شبکه‌های مولکولی مرتبط با پیشرفت بیماری‌های کبدی به‌طور دقیق‌تر مشخص شود (شکل ۱).



شکل ۱. چکیده تصویری

روش کار

مطالعه بیوانفورماتیکی

پایگاه داده TCGA

داده‌های بیان miRNA مربوط به سرطان کبد (LIHC) از پایگاه اطلس ژنوم سرطان (TCGA) با استفاده از بسته TCGAbiolinks در R نسخه ۴,۵,۱ استخراج شدند. در مجموع، داده‌های ۳۷۴ نمونه توموری و ۵۰ نمونه بافت نرمال جامد مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های خام شمارش خوانش (raw read counts) برای تحلیل استفاده شدند. miRNAهای با بیان پایین با استفاده از تابع filterByExpr در بسته edgeRفیلتر شدند و پس از این مرحله، ۴۴۳ miRNA از مجموع ۱۸۸۱ miRNA برای تحلیل باقی ماندند. سپس، نرمال‌سازی داده‌ها با روش Trimmed Mean of M-values (TMM) در بسته edgeR انجام شد و داده‌های نرمال‌شده به مقادیر log2- log2 counts per million (CPM)تبدیل شدند. کیفیت داده‌ها و الگوی کلی بیان در سطح نمونه با استفاده از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) ارزیابی شد و نمونه‌های بالقوه پرت بررسی شدند.

برای شناسایی miRNA های دارای بیان تفاضلی بین نمونه‌های توموری و نرمال، از بسته limma استفاده شد. مقادیر P با روش Benjamini–Hochbergبرای کنترل نرخ کشف کاذب اصلاح شدند miRNAهایی با adjusted P-value < ۰/۰۵ و |log2FC| > 1 به‌عنوان miRNA های دارای بیان تفاضلی معنی‌دار در نظر گرفته شدند. در ادامه، با توجه به هدف مطالعه، miRNAهای دارای کاهش بیان (log2FC < -1 و adjusted P-value < 0.05) به‌عنوان کاندیدهای بالقوه انتخاب شدند. همچنین داده‌های بیان miRNA به‌منظور کاهش تغییرات ناشی از عوامل فنی و اطمینان از قابلیت مقایسه بین نمونه‌ها، نرمال‌سازی شدند. پس از نرمال‌سازی و اعمال تبدیل مناسب بر مقادیر بیان، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) به‌منظور ارزیابی ساختار کلی مجموعه داده‌ها، شناسایی نمونه‌های بالقوه پرت و بررسی جداسازی نمونه‌های توموری و نرمال بر اساس پروفایل کلی بیان miRNA انجام شد. PCA با استفاده از ماتریس بیان miRNA نرمال‌شده انجام گرفت و دو مؤلفه اصلی اول برای ارزیابی توزیع نمونه‌ها و تغییرات بین گروهی به‌صورت نمودار نمایش داده شدند.

شناسایی ژن‌های هدف miR-193b-5p و بررسی بیان معکوس آن‌ها در LIHC

برای بررسی و پیش بینی نقش تنظیمی miR-193b-5p، ژن‌های مورد هدف miR-193b-5p از پایگاه UALCAN استخراج و ژن‌های دارای بیان معکوس(ژن‌های افزایش بیان یافته) در LIHC شناسایی شدند. ژن‌های افزایش بیان یافته در سرطان کبد برای تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند و فهرست کامل آن‌ها در فایل‌های تکمیلی ارائه شده است https://ualcan.path.uab.edu/. همچنین با استفاده از پایگاه داده UALCAN سطح بیان ژن‌های CLTC و AP2M1 در نمونه‌های LIHCبا بافت کبدی نرمال مقایسه شد. همچنین، برای بررسی ارزش پیش‌آگهی این ژن‌ها، بیماران بر اساس سطح بیان CLTC و AP2M1 به گروه‌های دارای بیان بالا و پایین تقسیم شده و منحنی‌های Kaplan–Meierبرای ارزیابی بقای کلی (Overall Survival) ترسیم شدند. تفاوت بین منحنی‌های بقا با استفاده از آزمون Log-rank ارزیابی شد و مقدار P < ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

تحلیل غنی‌سازی

از پایگاه STRING برای ایجاد شبکه تعامل پروتئین–پروتئین (PPI) و انجام تحلیل‌های غنی‌سازی عملکردی استفاده شد. این تحلیل‌ها با هدف شناسایی فرایندهای زیستی، مسیرهای مولکولی و فنوتیپ‌های مرتبط با پروتئین‌های مورد مطالعه انجام شدندhttps://string-db.org. همچنین، پایگاه Enrichr برای انجام تحلیل Gene Ontology (GO) بر روی ژن‌های هدف miR-193b-5p که در LIHC دارای افزایش بیان بودند، استفاده شد. شبکه‌ای از این ژن‌ها و مسیرهای مرتبط با استفاده از داده‌های MGI Mammalian Phenotype، فرایندهای زیستی GO و مسیرهای Human KEGG https://maayanlab.cloud/Enrichr/?utm_source=chatgpt.com

ایجاد شد. CLTC و AP2M1 بر اساس نتایج تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و شناسایی آن‌ها در مسیرهای مرتبط با متابولیسم لیپید، اندوسیتوز و کاتابولیسم ذرات گیرنده LDL به‌عنوان ژن‌های کاندید برای اعتبارسنجی تجربی انتخاب شدند.

بررسی‌های آزمایشگاهی

افراد گروه کنترل بر اساس نداشتن سابقه بیماری‌های کبدی، بیماری‌های مزمن عمده، بدخیمی و سایر شرایط مرتبط با معیارهای خروج از مطالعه انتخاب شدند. پس از توضیح اهداف مطالعه و اخذ رضایت آگاهانه کتبی، نمونه‌های خون محیطی از تمامی شرکت‌کنندگان جمع‌آوری شد. استخراج RNA تام مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از YTzol Pure RNA (Yekta Tajhiz Azma, Iran; Cat. No. YT9064/YT9065/YT9066) انجام شد. این فرایند به‌طور خلاصه، نمونه‌ها با معرف YTzol همگن شدند و پس از افزودن کلروفرم، جداسازی فازها انجام گرفت. فاز آبی حاوی RNA به لوله جدید منتقل و RNA با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب RNA با اتانول ۷۰٪ شست‌وشو داده و پس از خشک‌شدن کوتاه‌مدت، در آب عاری از RNase حل شد و نهایتا اندازه‌گیری غلظت RNAبا استفاده از Biophotometer اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Germany) انجام شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز (Yekta Tajhiz Azma, Iran; cDNA YTA-cDNA Synthesis Kit Cat. No. YT4500) جهت بررسی بیان ژن‌هایCLTC ، AP2M1 و GAPDH با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer وOligo(dT) انجام شد همچنین برای سنتز cDNA اختصاصی miR-193b-5p، Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Japan; Cat. No. 638315) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. سطح بیان نسبی miR-193b-5pو ژن‌های CLTC، AP2M1و GAPDHبا استفاده از RealQ Plus 2× Master Mix Green (no ROX; Ampliqon A/S, Denmark; Cat. No. A323499)ارزیابی شد. U6 ژن مرجع برای بررسی بیان نسبی miR-193b-5p بود. پرایمرهای اختصاصی ژن‌های CLTC، AP2M1 و ژن مرجع GAPDH با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و برای سنتز به شرکت ژن فناوران (ایران، تهران) سفارش داده شدند (جدول ۲). واکنش qRT-PCR در ۳۵ چرخه و در سه مرحله اصلی شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال (Annealing) در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و گسترش (Extension) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰

آنالیز بیان نسبی ژن با استفاده از qRT-PCR

در این مطالعه، نمونه‌های خون محیطی از ۲۵ بیمار مبتلا به کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) مراجعه‌کننده به بیمارستان سیدالشهدا در اصفهان و ۲۵ فرد سالم مراجعه‌کننده به آزمایشگاه آذر مهر در اصفهان جمع‌آوری شد. ویژگی‌های بالینی و دموگرافیک تمامی شرکت‌کنندگان ثبت و در جدول ۱ ارائه شد.

جدول ۱. ویژگی‌های جمعیت‌شناختی و بالینی بیماران مبتلا به HCC و گروه کنترل

متغیر	بیماران HCC (n = ۲۵)	کنترل
سن (سال)	۶۰/۳± ۹/۸	۵۳/۳± ۸/۵
جنس (مرد/زن)	۱۸/۷	۱۴/۱۱
BMI (kg/m²)	۲۶/۷±۳/۱	۳/۲±۲۶/۷
ALT (U/L)	۸۲/۵±۳۵/۴	–
AST (U/L)	۲۸/۹±۷۰/۸	–
AFP (ng/mL)	۱۸۰/۶±۳۵۵/۲	–
سیروز کبدی (%)	۶۳٪	-
HBV مثبت (%)	۳۶٪	-
HCV مثبت (%)	۲۶٪	-
NASH زمینه‌ای (%)	۴۰٪	-
اندازه تومور (میانگینcm)	۴/۸±۱/۹	-
تعداد تومور (تکی/چندگانه)	۱۶/۹	-
مرحله بیماری (ابتدایی/میانی/پیشرفته)	۸/۱۱/۶	-

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد، تعداد، درصد (٪) یا نسبت ارائه شده‌اند. اختصارات: BMI = شاخص توده بدنی، ALT = آلانین آمینوترانسفراز، AST = آسپارتات آمینوترانسفراز، AFP = آلفا–فتوپروتئین، HBV = ویروس هپاتیت B، HCV = ویروس هپاتیت C، NASH = استئاتوهپاتیت غیرالکلی. مرحله بیماری بر اساس سیستم TNM یا BCLC دسته‌بندی شده است.

ثانیه انجام شد. در نهایت، منحنی‌های melting برای بررسی اختصاصیت واکنش رسم شد و میزان بیان نسبی با استفاده از روش $2^{-}\Delta\Delta Ct$ محاسبه گردید.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش qRT-PCR

ژن	پرایمر فوروارد	پرایمر ریورس
CLTC	5’CAGGAGCATCTCCAGCTCC3’	5’TATCAATGATTACCACCTGG3’
AP2M1	5’GGCCGAGGACACCAGGTCTG3’	5’GATGTCATCTCGGTAGAC3’
GAPDH	5’GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC3’	5’CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT3’

آنالیز آماری

تحلیل‌های آماری و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸/۰ انجام شد نرمال‌بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون Shapiro–Wilk بررسی شد. برای مقایسه متغیرهای کیفی از آزمون کای‌دو (Chi-square test) استفاده شد. داده‌های کمی به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SD) گزارش شدند و برای مقایسه آن‌ها بین دو گروه از آزمون t مستقل (Independent samples t-test) استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین سطوح بیان miR-193b-5pو بیان ژن‌های CLTC وAP2M1 ، آزمون همبستگی پیرسون (Pearson’s correlation) انجام شد. ضریب همبستگی (r) و مقدار P برای ارزیابی شدت و معنی‌داری آماری ارتباط بین متغیرها محاسبه شدند. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) به‌عنوان سطح معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد. در مواردی که مقایسه‌های متعدد انجام شد، مقادیر P با استفاده از روش مناسب برای اصلاح آزمون‌های متعدد تعدیل شده و مقادیرP تعدیل‌شده (adjusted P-value) نیز گزارش شدند.

جدول ۳. مقایسه بیان miR-193b-5p، CLTC و AP2M1 در نتایج qRT-PCR و داده‌های TCGA-LIHC

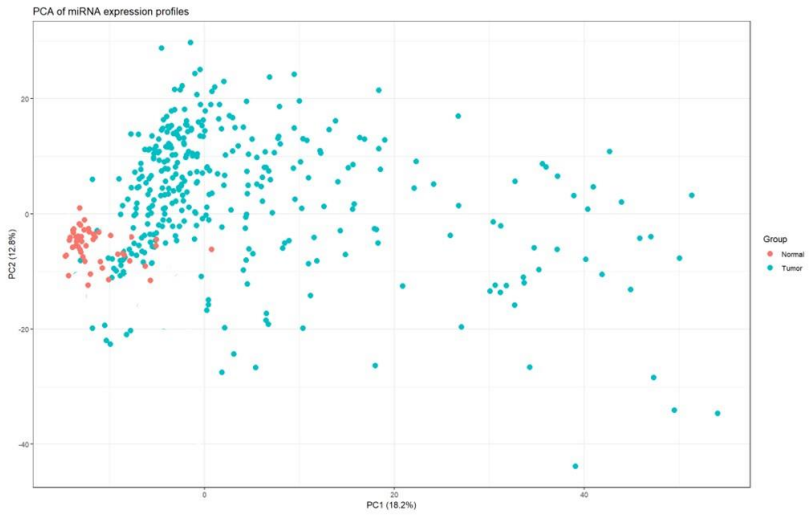
هدف مولکولی	qRT-PCR: کنترل (Mean ± SD)	qRT-PCR: NASH-HCC (Mean ± SD)	P-value	UALCAN: میانگین نرمال	UALCAN: میانگین HCC	log2FC	P-value	Pتعدیل‌شده
hsa-miR-193b-5p	۴/۲۱۵±۳/۱۱۲	۰/۸۲۰۵±۰/۴۹۷۱	<۰/۰۰۰۱	—	—	-۰/۳۹	۰/۰۰۰۱۳۸	۰/۰۰۰۲۲۴
CLTC	۱/۰۲۹±۰/۹۵۸۵	۲/۴۳۴±۰/۹۴۳۱	<۰/۰۰۰۱	۲۸/۸۱	۴۵/۷۵	—	<۰/۰۰۰۱	—
AP2M1	۱/۲۳۳±۱/۳۴۲	۴/۷۰۵±۲/۸۶۴	<۰/۰۰۰۱	۷۴/۶۲	۱۳۴/۳۸	—	<۰/۰۰۰۱	—

یافته‌ها

نتایج بیوانفورماتیکی

شناسایی miRNAهای دارای بیان تفاضلی در داده‌های TCGA-LIHC

با استفاده از مجموعه داده TCGA-LIHC، تحلیل بیان تفاضلی بر روی پروفایل‌های بیان miRNA انجام شد که شامل ۳۷۴ نمونه توموری اولیه و ۵۰ نمونه بافت طبیعی کبد بود. پس از نرمال‌سازی داده‌های بیانmiRNA ، تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) به‌منظور ارزیابی توزیع نمونه‌ها، تغییرپذیری کلی بیان و شناسایی نمونه‌های بالقوه پرت انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، نمونه‌های توموری و بافت‌های طبیعی کبد الگوهای توزیع متفاوتی را در فضای مؤلفه‌های اصلی نشان دادند که بیانگر تفاوت کلی در الگوی بیان miRNA بین دو گروه بود.این الگوی کلی، همراه با نبود پراکندگی غیرعادی در نمونه‌های باقی‌مانده، نشان‌دهنده کیفیت و انسجام قابل‌قبول داده‌های نرمال‌شده و مناسب‌بودن آن‌ها برای انجام تحلیل‌های بعدی بود. مؤلفه اصلی اول (PC1) و مؤلفه اصلی دوم (PC2) به‌ترتیب ۱۸/۲ درصد و ۱۲/۸ درصد از واریانس کل داده‌ها را توضیح دادند.

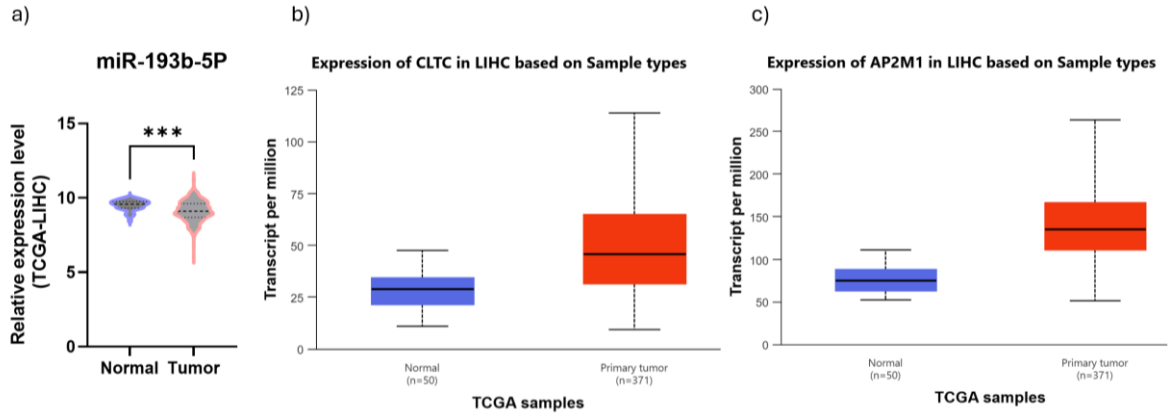


شکل ۲. تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) داده‌های بیان miRNA پس از نرمال‌سازی

الگوی توزیع و تمرکز نسبی نمونه‌ها در گروه‌های مورد مطالعه بود. این الگوی کلی، همراه با عدم وجود پراکندگی غیرعادی در نمونه‌های باقی‌مانده، نشان‌دهنده کیفیت و انسجام قابل‌قبول داده‌های نرمال‌شده برای انجام تحلیل‌های بعدی است PC1 .و PC2 به‌ترتیب ۱۸/۲ و ۱۲/۸ درصد از واریانس کل را توضیح دادند.

تحلیل داده‌های TCGA-LIHC نشان داد که از مجموع ۱۸۸۱ miRNA، تعداد ۴۴۳ miRNA پس از حذف miRNAهای کم‌بیان برای تحلیل باقی ماندند. تحلیل بیان تفاضلی بین نمونه توموری و نمونه نرمال، ۶۳ miRNA با بیان تفاضلی معنی‌دار را شناسایی کرد که شامل ۱۷ miRNA با افزایش بیان و ۴۶ miRNA با کاهش بیان بودند.

مقایسه داده‌های miRNA در مجموعه TCGA نشان داد که hsa-miR-193b-5pدر نمونه‌هایLIHC نسبت به گروه کنترل کاهش بیان داشت.(log2FC = −0.39, P = 0.000138, adjusted P = 0.000224) (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج تحلیل داده‌های بیان ژن از پایگاه TCGA برای کارسینوم هپاتوسلولار (LIHC)

(a) نمودار جعبه‌ای (boxplot) نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان miR-193b-5p در بافت توموری نسبت به بافت سالم (Log2FC = -0.39، adj.P.Val = 0.000224). (b) افزایش بیان ژن CLTC در نمونه‌های توموری در مقایسه با نمونه‌های غیرتوموری P <۰/۰۰۰۱ . (c) افزایش بیان ژن AP2M1 در بافت‌های توموری. داده‌ها از ۳۷۴ نمونه تومور اولیه و ۵۰ نمونه بافت طبیعی کبد استخراج شده‌اند۰/۰۰۰۱ > P.

شناسایی ژن‌های هدف miR-193b-5p و بررسی بیان معکوس آن‌ها

برای بررسی نقش عملکردی آن در پیشرفت بیماری، ژن‌های هدف miR-193b-5pاز پایگاه داده TCGA استخراج شدند و الگوی بیان آن‌ها در نمونه‌های LIHC مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۲۵۱ ژن هدف برای miR-193b-5p شناسایی شد که از این میان ۸۱ ژن دارای الگوی بیان معکوس با miR-193b-5p بوده و در LIHC به‌طور

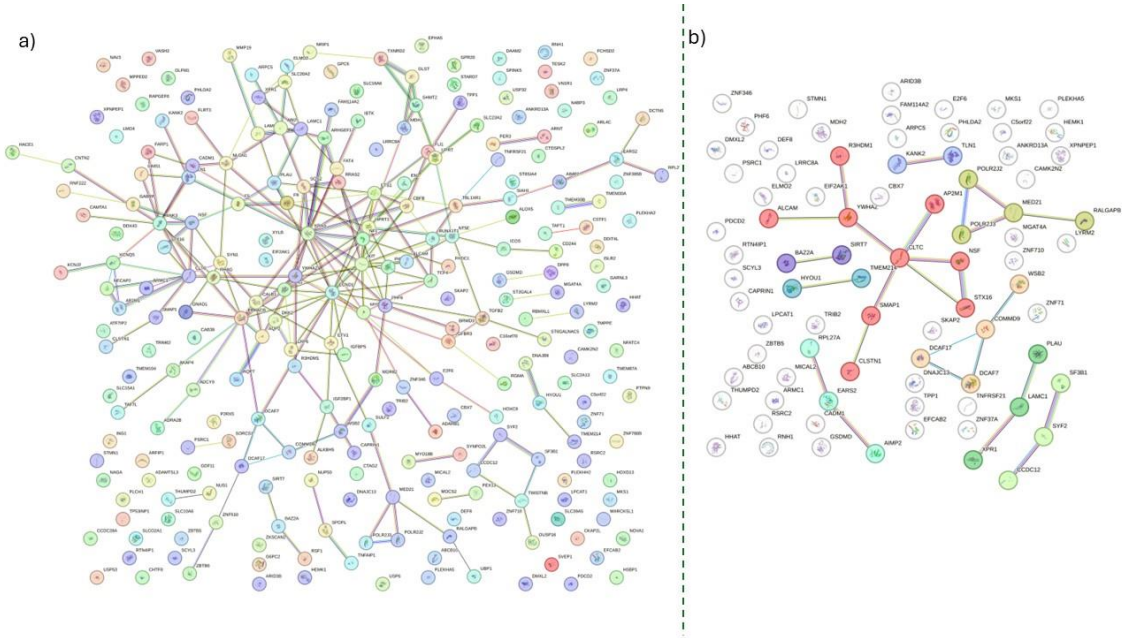
معنی‌داری افزایش بیان یافته بودند، که نشان‌دهنده یک رابطه تنظیمی بالقوه با miR-193b-5p است. از میان این ۲۵۱ ژن تنها ۸۱ ژن ذکر شده برای تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند (داده‌های تکمیلی ۱).

۳،۱،۳. شبکه برهم‌کنش پروتئین–پروتئین (PPI) و تحلیل خوشه‌بندی

شبکه PPI با استفاده از پایگاه STRING ساخته شد که وجود ۹ خوشه عملکردی متمایز را در شبکه نشان داد (شکل ۴a). لینک شبکه تعاملی در آدرس زیر در دسترس است:

https://version-12-0.string-db.org/cgi/network?networkId=boDKt5ykm336 .

تحلیل شبکه تعاملات پروتئینی نشان داد که به طور کلی ۲۵۱ ژن ذکر شده یک شبکه معنادار و غیرتصادفی تشکیل می‌دهند (PPI enrichment p-value = 0.00769)، که بیانگر ارتباط بیولوژیکی قابل توجه میان این ژن‌ها و مشارکت آن‌ها در یک چارچوب تنظیمی مشترک است. این موضوع نشان می‌دهد که ژن‌های حاضر به‌صورت مستقل عمل نمی‌کنند، بلکه بخشی از یک شبکه عملکردی هماهنگ در فرآیندهای سلولی هستند (شکل ۴b).



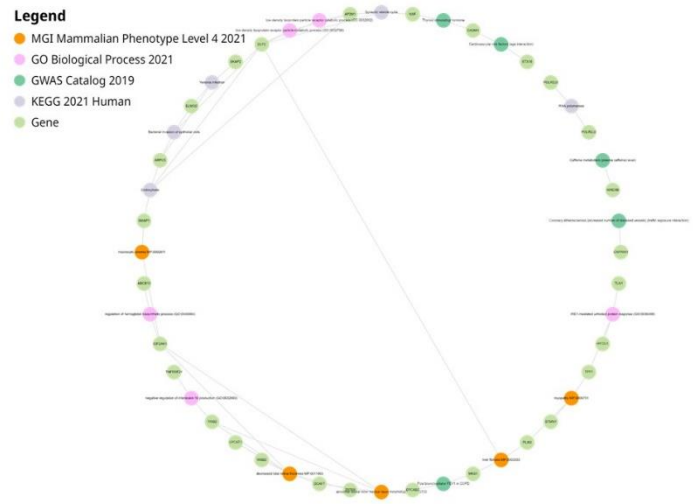
شکل ۴. شبکه PPI برای ژن‌های هدف miR-193b-5p

(a) شبکه شامل ۲۵۱ گره (پروتئین) و ۲۲۸ یال (برهم‌کنش) با میانگین درجه گره ۱/۸۲ و ضریب خوشه‌بندی محلی ۰/۳۳۸ است. تعداد یال‌های مورد انتظار ۱۹۱ و مقدار PPI enrichment p-value برابر۰/۰۰۴۷۳ به‌دست آمد که نشان‌دهنده برهم‌کنش‌های معنی‌دار بیشتر از حد تصادفی و وجود ارتباط عملکردی میان ژن‌هاست. (b) زیرشبکه شامل ۸۱ ژن با بیان معکوس نسبت به miR-193b-5p (افزایش‌یافته در LIHC) که دارای ۲۶ یال، میانگین درجه ۰/۶۴۲ و ضریب خوشه‌بندی۰/۳۰۶ است. مقدار PPI enrichment p-value برابر ۰/۱۱۵ بوده که از نظر آماری معنی‌دار نیست، اما چندین پروتئین کلیدی با برهم‌کنش قابل‌توجه (از جمله CLTC و AP2M1) را نشان می‌دهد که می‌توانند واسطه‌های عملکردی در مسیرهای تنظیمی مرتبط با HCC باشند. نسخه تعاملی شبکه در آدرس https://version-12-0.string-db.org/cgi/network?networkId=boDKt5ykm336 قابل دسترسی است.

تحلیل غنی‌سازی عملکردی و مسیرهای زیستی مرتبط

تحلیل‌های غنی‌سازی این ۸۱ ژن افزایش بیان یافته نشان داد که آن‌ها در مسیرهای زیستی مهمی نقش دارند. هرچند نتایج غنی‌سازی برای این تعداد ژن معنی‌دار نبود، اما بر اساس Gene Ontology، ژن‌های CLTC و AP2M1 در فرآیندهای متابولیسم و کاتابولیسم ذرات گیرنده LDL نقش دارند.

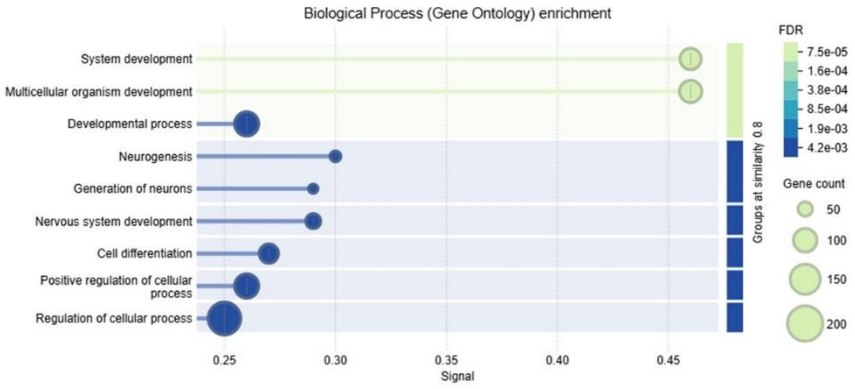
در مسیرهای KEGG، ژن‌های AP2M1، ARPC5، CLTC و SMAP1با مسیر اندوسیتوز مرتبط بودند، در حالی کهPOLR2J3 و POLR2J2در مسیر RNA polymerase نقش داشتند. در مطالعات GWASنیز ارتباط هورمون محرک تیروئید با ژن‌های NSF و CADM1، عوامل خطر قلبی–عروقی با STX16 و CADM1، و متابولیسم کافئین (سطح پلاسمایی کافئین) با ARID3B گزارش شد (شکل ۵).



شکل ۵. تحلیل غنی‌سازی عملکردی زیرشبکه ۸۱ ژنی با بیان معکوس نسبت به miR-193b-5p در LIHC

براساس پایگاه‌های GO و KEGG، این زیرشبکه به‌طور قابل‌توجهی در مسیرهای مرتبط با متابولیسم لیپید و فرایندهای وابسته به انتقال وزیکولی غنی شده است. ژن‌های CLTC و AP2M1 قوی‌ترین ارتباط را با فرایندهای «متابولیسم ذرات گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پایین» (GO:0032799) و «کاتابولیسم گیرنده ذرات لیپوپروتئین با چگالی پایین» (GO:0032802) نشان دادند که اهمیت مسیرهای جذب و انتقال لیپید را در پاتوژنز بیماری برجسته می‌سازد. همچنین مسیرهای اندوسیتوز (KEGG) و RNA پلیمراز نیز در میان نتایج دیده می‌شوند (FDR < ۰/۰۵).

نتایج غنی‌سازی عملکردی نشان داد که مسیرهای مرتبط با این شبکه تنها به فرآیندهای توسعه عصبی محدود نمی‌شوند، بلکه طیف گسترده‌ای از مسیرهای زیستی شامل توسعه سیستم‌های زیستی، تمایز سلولی و تنظیم فرآیندهای سلولی را در بر می‌گیرند. این مسیرها از نظر زیستی ارتباط نزدیکی با پاتوژنز کبد چرب غیرالکلی (NAFLD/NASH) دارند (شکل۶).



شکل ۶. تحلیل غنی‌سازی عملکردی (Gene Ontology) برای شبکه ۲۵۱ ژنی هدف miR-193b-5p

نوارهای افقی نشان‌دهنده فرایندهای زیستی (Biological Processes) با غنی‌سازی معنی‌دار بر اساس پایگاه داده Enrichr هستند. مسیرهای شناسایی‌شده عمدتاً شامل توسعه سیستم‌ها (System development)، تکامل موجودات چندسلولی، نورون‌زایی، توسعه سیستم عصبی، تمایز سلولی، تنظیم مثبت فرآیندهای سلولی و فرایندهای تکاملی می‌باشند. این نتایج حاکی از نقش بالقوه این شبکه ژنی در تنظیم فرایندهای زیستی کلیدی و پیشرفت کارسینوم هپاتوسلولار است (معیارهای آماری:adjusted P-value < ۰/۰۵).

نتایج آزمایشگاهی

بیان miR-193b-5p و ژن‌های CLTC و AP2M1 در NASH-HCC

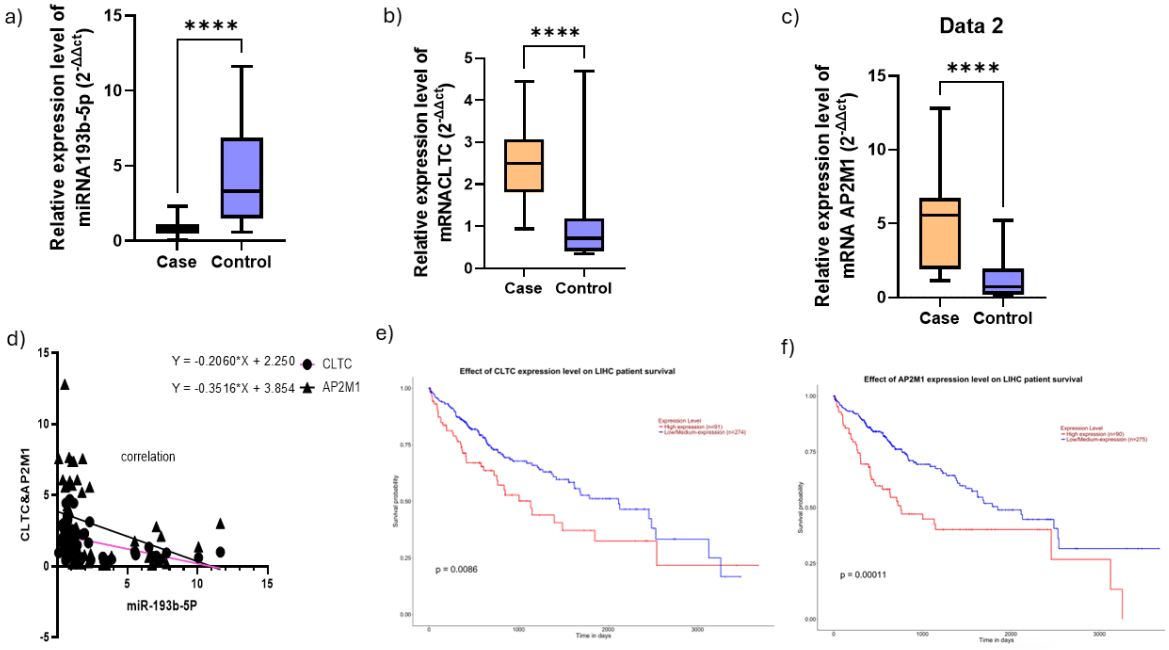
نتایج qRT-PCR نشان داد که بیان نسبی miR-193b-5pدر بیماران مبتلا به NASH-HCC در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. میانگین بیان miR-193b-5p در گروه NASH-HCCبرابر با ۰/۸۲۰۵±۰/۴۹۷۱ و در گروه کنترل برابر با ۴/۲۱۵±۳/۱۱۲ بود و اختلاف میانگین بین دو گروه معنادرا بود، P < ۰/۰۰۰۱؛ (شکل ۷a).

در مقابل، بیان نسبی CLTCدر گروه NASH-HCC (2.434 ± 0.9431) در مقایسه با گروه کنترل (1.029 ± 0.9585) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P < 0.0001) (شکل ۷b).

همچنین، بیان AP2M1 در گروه NASH-HCC (۴/۷۰۵ ± ۲/۸۶۴) نسبت به گروه کنترل (۱/۲۳۳±۱/۳۴۲) افزایش معنی‌داری نشان داد (P <۰/۰۰۰۱)؛ (شکل ۷c) تحلیل همبستگی نشان داد که بین بیان

miR-193b-5pو هر دو ژن CLTC وAP2M1 رابطه منفی و معنی‌داری وجود دارد.

ضریب همبستگی بین miR-193b-5p و CLTC برابر با r=−۰/۴۸۸۲(P=۰/۰۰۰۳) و بین miR-193b-5p وAP2M1 برابر با r= −۰/۳۴۷۸(P=۰/۰۱۳۳)بود. این نتایج بر اساس ۵۰ نمونه جفت‌شده به دست آمدند و هر دو ارتباط از نظر آماری معنی‌دار بودند (P< ۰/۰۵) (شکل ۷d-f).



شکل ۷. نتایج آزمایشگاهی تأیید بیان افتراقی miR-193b-5p و ژن‌های هدف در بیماران مبتلا به HCC با استفاده از qRT-PCR

(a) کاهش معنی‌دار بیان miR-193b-5p در بیماران (n=۲۵) نسبت به گروه کنترل (n=۲۵) (P < ۰/۰۰۰۱). (b) افزایش بیان ژن CLTC در گروه بیماران (P < ۰/۰۵). (c) افزایش بیان ژن AP2M1 در گروه بیماران (P <۰/۰۵). (d) همبستگی منفی معنی‌دار میان miR-193b-5p با CLTC (r = -0.4882, P = 0.0133)، AP2M1 (r = -0.3478, P = 0.0003) بر اساس ۵۰ جفت نمونه. (e) و (f) به‌ترتیب منحنی‌های بقا (survival curves) نشان‌دهنده ارتباط افزایش بیان CLTC و AP2M1 با پیش‌آگهی ضعیف و کاهش بقای بیماران مبتلا به HCC (Log-rank test, P < 0.05). (سطح معنی‌داری: P < 0.05*، P < 0.01 **، P < 0.001 ***).

بحث

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اختلال در مسیرهای مرتبط با انتقال وزیکولی، اندوسیتوز و هموستاز لیپیدی نقش مهمی در پاتوژنز بیماری NAFLD و پیشرفت آن به NASH و HCC دارد (۱۷, ۱۸). در مطالعه حاضر، تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان دادند که ژن‌های هدف miR-193b-5p، به‌ویژه CLTC وAP2M1، در بافت‌های LIHC دارای افزایش بیان بوده و با miR-193b-5p همبستگی منفی دارند؛ موضوعی که می‌تواند بیانگر نقش تنظیمی این miRNA در مسیرهای متابولیک و سرطان‌زایی کبد باشد.

این یافته‌ها با مطالعات پیشین که افزایش CLTC و نقش مسیرهای وابسته به اندوسیتوز را در زیست‌شناسی HCC گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد. برای مثال، یک مطالعه تجربی نشان داد که CLTC در HCC افزایش یافته و در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تومورزایی کبد، از جمله TGF-β/EGFR، نقش دارد (۱۹). همچنین، یک مطالعه پروتئومیکس کمی نشان داد که CLTC از جمله پروتئین‌های مرتبط با اندوسیتوز است که در HCC افزایش می‌یابد و افزایش آن با کاهش تمایز تومور ارتباط دارد(۲۰). از سوی دیگر، مطالعات تجربی پیشین نیز نقش سرکوبگر توموری miR-193b-5p را در سرطان کبد نشان داده‌اند و گزارش کرده‌اند که اختلال در بیان این miRNA می‌تواند بر تکثیر، مهاجرت و آپوپتوز سلول‌های سرطانی اثر بگذارد (۲۱). همچنین، شواهد تجربی جدیدی نقش AP2M1 را در ویژگی‌های مرتبط با HCC (۲۲) نشان داده‌اند که می‌تواند اهمیت احتمالی ماشین اندوسیتوز وابسته به clathrin را در زیست‌شناسی سرطان کبد تقویت کند. ژن CLTC کدکننده زنجیره سنگین clathrin است که در تشکیل وزیکول‌های وابسته به clathrin و فرآیند اندوسیتوز نقش اساسی دارد (۲۳). این ژن در تنظیم انتقال گیرنده‌های LDL، انتقال داخل‌سلولی لیپوپروتئین‌ها و تنظیم ورود اسیدهای چرب به سلول‌های کبدی مشارکت می‌کند (۲۶-۲۴). افزایش بیان CLTC می‌تواند منجر به تغییر در uptake لیپیدها، اختلال در هموستاز چربی و تجمع تری‌گلیسرید در هپاتوسیت‌ها شود که از ویژگی‌های اصلی استئاتوز کبدی محسوب می‌شود (۲۷). علاوه بر این، CLTC در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با بقا از جمله PI3K/AKT و نیز پاسخ به استرس سلولی و اتوفاژی نقش دارد؛ مسیرهایی که در پیشرفت NASHو تبدیل آن به HCC اهمیت بالایی دارند (۲۸). از سوی دیگر،

AP2M1 به‌عنوان یکی از زیرواحدهای کمپلکس AP-2 در اندوسیتوز وابسته به clathrin نقش دارد و درinternalization گیرنده‌ها، انتقال وزیکولی و تنظیم سیگنالینگ متابولیک دخیل است. افزایش بیان AP2M1می‌تواند باعث افزایش فعالیت اندوسیتوزی و تغییر در انتقال لیپوپروتئین‌ها و گیرنده‌های متابولیکی شود. این فرآیندها نه‌تنها در تجمع چربی و مقاومت به انسولین نقش دارند، بلکه می‌توانند موجب تغییرات متابولیکی مرتبط با سرطان‌زایی در سلول‌های کبدی شوند (۲۹، ۳۰).

نتایج تحلیل غنی‌سازی ۸۱ ژن در مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژن‌های هدف miR-193b-5p در مسیرهایی مانند متابولیسم لیپید، انتقال وابسته به وزیکول، اندوسیتوز، پاسخ به استرس سلولی و بازسازی ماتریکس خارج‌سلولی غنی شده‌اند. این یافته‌ها با مطالعات قبلی همخوانی دارند که نشان داده‌اند اختلال در مسیرهای انتقال وزیکولی و trafficking سلولی می‌تواند موجب تجمع لیپید، افزایش استرس اکسیداتیو، التهاب مزمن و در نهایت فیبروز کبدی شود (۱۷). علاوه بر این، افزایش uptake اسیدهای چرب و LDL از طریق مسیرهای وابسته به اندوسیتوز و clathrin، که ژن‌هایی مانند CLTC و AP2M1 در آن نقش دارند، می‌تواند استئاتوز و استرس متابولیکی را تشدید کند (۳۱، ۳۲). فعال شدن مسیر PI3K/AKT نیز در پاسخ به این تغییرات متابولیکی می‌تواند موجب افزایش بقا سلولی، مقاومت به انسولین و فعال شدن مسیرهای سرطان‌زایی شود (۳۳).

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش بیان miR-193b-5pممکن است با افزایش بیان ژن‌های هدفی مانندCLTC و AP2M1همراه باشد و از این طریق در اختلال مسیرهای متابولیسم چربی، اندوسیتوز و سیگنالینگ مرتبط با بقا نقش داشته باشد. این تغییرات می‌توانند زمینه‌ساز پیشرفت NASH به HCC شوند. بنابراین، miR-193b-5p و ژن‌های هدف آن ممکن است به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه و همچنین اهداف درمانی جدید در بیماری‌های کبدی مرتبط با متابولیسم مطرح شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کاهش بیان miR-193b-5pمی‌تواند نقش مهمی در توسعه HCC داشته باشد. این کاهش بیان با اختلال در تنظیم ژن‌های CLTC و AP2M1 همراه است که در مسیرهای کلیدی از جمله متابولیسم لیپید، انتقال وابسته به وزیکول، اندوسیتوز و مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با بقا نقش دارند. از بین رفتن تنظیم‌گری miR-193b-5p ممکن است منجر به اختلال در هموستاز لیپید، افزایش فعالیت اندوسیتوزی و فعال شدن مسیرهای مرتبط با سرطان‌زایی مانند PI3K/AKT شود؛ مسیرهایی که در پیشرفت NASH به HCC اهمیت اساسی دارند.

این یافته‌ها بر اساس تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و آنالیزهای غنی‌سازی عملکردی به دست آمده‌اند و نشان‌دهنده نقش بالقوه miR-193b-5p به‌عنوان یک گره تنظیمی مهم در پاتوژنز بیماری‌های کبدی هستند.

ملاحظات اخلاقی

تمامی شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه کتبی آگاهانه جهت انتشار داده‌های ژنتیکی و سایر اطلاعات مرتبط خود ارائه کرده‌اند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تأیید شده و مطابق با اصول و کدهای اخلاق پژوهش انجام شده است. کد اخلاق این مطالعه IR.IAU.SHK.REC.1403.283 :می‌باشد. در این پژوهش از ابزارهای هوش مصنوعی استفاده نشده است.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

ف، ا: تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و نگارش اولیه؛ همکاری در تمام بخش‌ها. ف،ک: تحلیل آماری و ویرایش نهایی؛ با همکاری ف، ا؛ ن، ض،ج: انجام qRT-PCR و تحلیل داده‌ها با همکاری ف ا؛ ل،ک: جمع‌آوری نمونه‌ها و استخراج RNAبا همکاری ف، ا؛ س، ذ: طراحی و نظارت علمی مطالعه، همکاری در سایر بخش‌ها.

حمایت مالی

این مطالعه هیچ‌گونه حمایت مالی یا گرنتی دریافت نکرده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی افرادی که فراتر از وظایف رسمی خود در انجام فعالیت‌های آزمایشگاهی مشارکت داشته و تجربیات ارزشمند خود را در اختیار ما قرار دادند تا بر چالش‌های این پروژه غلبه کنیم، صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

References

1. Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28:64-70.
2. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. World J Gastroenterol. 2014;20(42):15539.
3. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. Hepatol. 2018;67(1):123-33.
4. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2017;23(47):8263.
5. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. Cellular and molecular life sciences: Cell Mol Life Sci. 2018;76(1):99.
6. Samarasinghe SM, Hewage AS, Siriwardana RC, Tennekoon KH, Niriella MA, De Silva S. Genetic and metabolic aspects of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenicity. Egypt J Med Human Genet. 2023;24(1):53.
7. Szabo G, Csak T. Role of MicroRNAs in NAFLD/NASH. Dig Dis Sci. 2016 May;61(5):1314-24.
8. Yousefi M, Hashemi M-S, Peymani M, Ghaedi K ,Irani S, Etemadifar M. Elucidating the Role of a Shared lncRNA-miRNA-mRNA Network in Exacerbating Parkinson's Disease Symptoms in the Context of COVID-19 Infection. Gene Expr. 2024;23(2):83-97.
9. Zailaie SA, Khoja BB, Siddiqui JJ, Mawardi MH, Heaphy E, Aljagthmi A, Sergi CM. Investigating the Role of Non-Coding RNA in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Noncoding RNA. 2024;10(1):10.
10. Du C, Shen L, Ma Z, Du J, Jin S. Bioinformatic analysis of crosstalk between circRNA, miRNA, and target gene network in NAFLD. Front Genet. 2021;12:671523.
11. Golchin ME, Chaleshtori SR, Golchin M, Shiasi A, Amirsoleimani F, Dolatabadi NF. Circ-MYO9B modulates metabolic pathways in nonalcoholic steatohepatitis via miR-193b-5p. Mol Biol Rep. 2025;53 (1):42.
12. Zheng Q, Bao C, Guo W, Li S, Chen J, Chen B, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. Nat Commun. 2016;7(1):11215.
13. Xu C, Liu S, Fu H, Li S, Tie Y, Zhu J, et al. MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. Eur J Cancer. 2010;46(15):2828-36.
14. Shen C, Li J, Zhang Q, Tao Y, Li R, Ma Z, et al. LncRNA GASAL1 promotes hepatocellular carcinoma progression by up-regulating USP10-stabilized PCNA. Exp Cell Res. 2022;415(1):112973.
15. Pang X, Wan W, Wu X, Shen Y. The Novel Action of miR-193b-3p/CDK1 Signaling in HCC Proliferation and Migration: A Study Based on Bioinformatic Analysis and Experimental Investigation. Int J Genom. 2022;2022(1):8755263.
16. Ye Y, Guo J, Xiao P, Ning J, Zhang R, Liu P, et al. Macrophages-induced long noncoding RNA H19 up-regulation triggers and activates the miR-193b/MAPK1 axis and promotes cell aggressiveness in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett. 2020;469:310-22.
17. Du J, Ji Y, Qiao L, Liu Y, Lin J. Cellular endo-lysosomal dysfunction in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int. 2020; 40 (2):271-80.
18. Seebacher F, Zeigerer A, Kory N, Krahmer N, editors. Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. Semin Cell Dev Biol; 2020:108:72-81.
19. Caballero-Díaz D, Bertran E, Peñuelas-Haro I, Moreno-Càceres J, Malfettone A, López-Luque J, et al. Clathrin switches transforming growth factor-β role to pro-tumorigenic in liver cancer. J Hepatol. 2020;72(1):125-34.
20. Naboulsi W, Bracht T, Megger DA, Reis H, Ahrens M, Turewicz M, et al. Quantitative proteome analysis reveals the correlation between endocytosis-associated proteins and hepatocellular carcinoma dedifferentiation. Biochim Biophys Acta. 2016;1864(11):1579-85.
21. Yin W, Nie Y, Chen L, Wang Q, Liu S ,He X, et al. Deregulation of microRNA-193b affects the proliferation of liver cancer via myeloid cell leukemia-1. Oncol Lett 2018;15(3):2781-8.
22. Ahn S, Baek SE, Yu Y, Kim ES, Myung K, Kim YH, et al. The role of AP2M1 in oncofetal characteristics: integrative in silico, in vitro, and in vivo analyses using zebrafish models. Eu J Med Res. 2025;31(1):15.
23. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. Na Rev Mol Cell Biol. 2018;19(5):313-26.
24. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(8):517-33.
25. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(5):a016725.
26. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. Cell Logist. 2012;2(4):203-8.
27. Breher-Esch S, Sahini N, Trincone A, Wallstab C, Borlak J. Genomics of lipid-laden human hepatocyte cultures enables drug target screening for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. BMC Med Genomics. 2018;11(1):111.
28. Safaroghli-Azar A, Sanaei M-J, Pourbagheri-Sigaroodi A, Bashash D. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) classes: From cell signaling to endocytic recycling and autophagy. Eur J Pharmacology. 2023;953:175827.
29. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6(6):a016758.
30. Azarnia Tehran D, López-Hernández T, Maritzen T. Endocytic adaptor proteins in health and disease: lessons from model organisms and human mutations. Cells. 2019;8(11):1345.
31. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2–depleted cells. The Journal of cell biology. 2003;162(5):909-18.
32. Boucrot E, Saffarian S, Zhang R, Kirchhausen T. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. PloS one. 2010;5(5):e10597.
33. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nat Rev Cancer. 2020;20(2):74-88.