

بررسی ارتباط چندشکلی rs17144343 G>A در ژن HULC LncRNA با استعداد بروز سقط خودبه خودی

مکرر در زنان آذربایجان شرقی، ایران

رضوان حاتمی^۱، دکتر سولماز منیری جوادحصاری^{۲*}، دکتر جعفر محسنی^۳، دکتر ناصر پولادی^۴

۱. کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
۲. استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
۳. استادیار ژنتیک پزشکی، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی، تبریز، ایران.
۴. دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۰۵

خلاصه

مقدمه: زنان با بیش از ۲ بار تجربه سقط جنین، مبتلا به سقط خودبه‌خودی مکرر هستند که حدود ۱/۴-۰/۸٪ زوجین را در برمی‌گیرند. ژن HULC به‌عنوان یک RNA غیررمزگذار بسیار مهم در سرطان کبد شناسایی شده و بعدها ارتباط آن با برخی از بیماری‌ها شامل سقط جنین مورد توجه قرار گرفت. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط چندشکلی تک-نوکلئوتیدی rs17144343 G>A در ژن HULC با استعداد سقط‌های خودبه‌خودی مکرر در جمعیت زنان آذربایجان شرقی انجام شد.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی که در سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ انجام گرفت، DNA ژنومی از خون محیطی ۱۵۰ فرد بیمار و ۱۵۰ فرد سالم به روش رسوب نمکی استخراج شد و ژنوتیپ افراد با استفاده از Tetra-ARMS-PCR تعیین شد. داده‌های ژنوتیپی با استفاده از بسته نرم‌افزاری آنلاین جاواستات و SPSS (نسخه ۲۳) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: توزیع ژنوتیپی rs17144343 برای ژنوتیپ‌های GA و GG به ترتیب در گروه بیماران ۲۴/۷٪ و ۷۵/۳٪ و در گروه کنترل ۲٪ و ۹۸٪ به دست آمد. همچنین فراوانی آلل A در افراد مبتلا ۱۲/۴٪ و در گروه شاهد ۱٪ بود. میان استعداد بروز سقط مکرر و چندشکلی rs17144343 G>A ژن HULC ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.001$). همچنین در بررسی ارتباط این چندشکلی با برخی ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیک، ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ‌های این لکوس و رابطه خویشاوندی والدین زوجین وجود داشت ($p = 0.003$).

نتیجه‌گیری: میان چندشکلی rs17144343 ژن HULC و استعداد ابتلاء به سقط خودبه‌خودی مکرر ارتباط معنی‌داری مشاهده شد. با این وجود، مطالعات بر روی نمونه جمعیتی بزرگ‌تر می‌تواند در تأیید بیشتر این یافته مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: چندشکلی تک نوکلئوتیدی rs17144343، ژن HULC LncRNA، سقط خودبه‌خودی مکرر

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سولماز منیری جوادحصاری؛ دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. تلفن: ۰۴۱-۳۱۴۵۲۰۶۱
پست الکترونیک: solmazmoniri@gmail.com

مقدمه

سقط جنین به ختم بارداری قبل از هفته بیستم اطلاق می‌گردد که شایع‌ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم بارداری می‌باشد. زنانی که بیش از دو بار سقط جنین را تجربه می‌کنند، مبتلا به سقط مکرر هستند (۱). سقط مکرر در هر ۳۰۰ زوج در یک مورد اتفاق می‌افتد. اطلاعات تجربی نشان می‌دهد که سابقه سقط، خطر سقط را در حاملگی‌های بعدی افزایش می‌دهد. خطر بروز سقط، در زنان بدون سابقه سقط قبلی ۱۲٪، زنان با یک سابقه سقط قبلی ۲۴٪، زنان با سه سابقه سقط قبلی ۳۲٪ و در زنانی با بیش از شش سابقه سقط ۵۳٪ افزایش می‌یابد (۲). سقط خودبه‌خودی مکرر (RPL)^۱ یک بیماری چندعاملی است و با تجمع عوامل مختلفی مانند ناهنجاری‌های آناتومیک رحمی، عوامل عفونی، عوامل هورمونی، عوامل ایمنولوژیک، عوامل محیطی و ژنتیکی ایجاد می‌شود (۳-۷). اخیراً، پیشرفت فناوری آزمایش‌های ژنتیکی نشان داده است که چند شکلی بودن بسیاری از ژن‌ها مانند ژن‌های دخیل در انعقاد خون شامل FXIII^۲، MTHFR^۲، فاکتور V لیدین و ژن پروترومبین، ژن بازدارنده فعال‌کننده پلاسمینوژن ۱ (PAI-1)^۳، ACE^۴، eNOS^۵، ژن‌های دخیل در رگ‌زایی (VEGF^۶ و HRG^۷)، ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی (CTLA4^۸، HLA-G^۹ و ADA^{۱۰}) و ژن‌های دخیل در متابولیسم سم‌زدایی (CYP1A1^{۱۱}) و GST^{۱۲} با حساسیت به سقط خودبه‌خودی مکرر مرتبط می‌باشند (۲۰-۸).

LncRNA^{۱۳}ها، رونوشت‌های مشابه mRNA هستند که اندازه آن‌ها در بازه ۲۰۰ نوکلئوتید تا کمتر از ۱۰۰ کیلوباز متغیر است و همه آن‌ها به استثنای موارد

اندکی، فاقد توانایی کد کردن پروتئین هستند (۲۱). تقریباً ۲۰۰۰۰ IncRNA برآورد شده است که نقش اکثر آنها ناشناخته است. با این وجود، مطالعات ژنتیکی زیادی اختلالات ژن‌های IncRNA را به توسعه بیماری‌های انسان نظیر دیابت، ایدز^{۱۴}، بیماری التهابی روده، یا سرطان ارتباط داده و پیشنهاد می‌کنند که نگاه بر مبنای پروتئین به بیماری‌های انسان، تمام پیچیدگی‌های مکانیسم‌های مولکولی بیماری را دربر نمی‌گیرد. در نتیجه، اخیراً نقش مهمی برای تشخیص و درمان بر مبنای مولکولی برای بسیاری از بیماری‌ها پیشنهاد می‌شود (۲۲).

اخیراً نتایج چند مطالعه تحقیقاتی در چین نشان داد که چندشکلی در lncRNAهای MALAT1^{۱۵}، CCAT2^{۱۶} و HULC^{۱۷} که در تنظیم ایمنی و تحرک سلولی نقش دارند، با استعداد ابتلاء به سقط خودبه‌خودی مکرر ارتباط نشان می‌دهد (۲۶-۲۳)، اما گزارشی در ارتباط با چندشکلی‌های مولکول‌های ذکر شده و بروز سقط مکرر در جمعیت ایران گزارش نشده است. هدف مطالعه حاضر، بررسی ارتباط چندشکلی در یکی از lncRNAهای درگیر در تنظیم ایمنی و تحرک سلولی، HULC، با استعداد سقط خودبه‌خودی مکرر در جمعیت زنان آذری ایران می‌باشد تا علاوه بر شناسایی فراوانی آللی استخر ژنی این جمعیت، ارتباط هر یک از آلل‌ها با بروز سقط خودبه‌خودی مکرر مورد آزمایش قرار گیرد.

ژن HULC در لکوس 6p24.3 با طول ۱۶۳۸pb قرار دارد و شامل دو اگزون و یک اینترون است. HULC بالغ اولین بار در سال ۲۰۰۷، به‌عنوان RNA غیررمزگذار با تنظیمات بسیار مهم در Hcc^{۱۸} کشف شد (۲۷). تحقیقات بیشتر بر روی HULC، آن را به‌عنوان یک RNA انکوژن در تومورهای متعدد از جمله سرطان استئوسارکوما، اپیتلیال تخمدان، سرطان مثانه، گلیوما، سرطان پانکراس، سرطان مری، سرطان معده، سرطان

¹ Recurrent pregnancy loss

² methylene tetra hydro folate reductase

³ Plasminogen activator inhibitor-1

⁴ angiotensin-converting enzyme

⁵ endothelial nitric oxide synthase

⁶ Vascular endothelial growth factor

⁷ histidine-rich glycoprotein

⁸ Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

⁹ human leukocyte antigen (HLA) class Ib genes -G

¹⁰ Adenosine Deaminase

¹¹ Cytochrome P450 1A1

¹² Glutathione S-transferase (GST)

¹³ Long Noncoding RNA

¹⁴ AIDS

¹⁵ Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

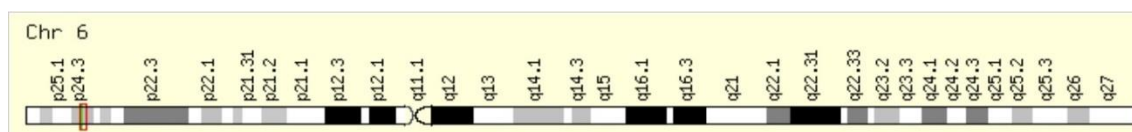
¹⁶ colon cancer associated transcript 2

¹⁷ Highly up-regulated in liver cancer

¹⁸ Hepatocellular carcinoma

پستان و سرطان کولورکتال پیشنهاد کرده است (۴۱-۲۸). بررسی چندشکلی ژن HULC در بیماران مبتلا به سقط خودبه‌خودی مکرر تنها در مطالعه فانگ و همکاران (۲۰۱۹) در کشور چین انجام گرفت. در این مطالعه چهار SNP^۱ به ترتیب شامل: rs1041279، rs7770772، rs17144343 و rs1328868 در این ژن مورد مطالعه قرار گرفتند که چندشکلی‌های rs1041279 و rs7770772 در پروموتور ژن HULC، rs1328868 در اگزون و

پس‌ترین فراوانی مربوط به ۳ سقط خودبه‌خودی بود. در گروه کنترل، ۸۰ نفر از زنان دارای ۲ تولد زنده سالم و ۷۰ نفر دیگر دارای ۳ تولد زنده یا بیشتر بودند.



استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ افراد

DNA ژنومی با استفاده از روش نمک اشباع (salting out) از نمونه‌های خون محیطی افراد مشارکت کننده در این مطالعه استخراج شد. سپس کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ تعیین گردید. برای بررسی چندشکلی G>A rs17144343 ژن HULC از روش Tetra-ARMS-PCR^۲ (استفاده شد. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار الیگو طراحی شدند که نام، توالی و مشخصات محصولات تکثیر یافته با هر جفت پرایمر در جدول ۱ آمده است.

روش کار

این مطالعه موردی - شاهدی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشکده علوم پایه دانشگاه شهید مدنی آذربایجان انجام گرفت. روش مطالعه از دستورالعمل‌های اخلاقی بیانیه ۱۹۷۵ هلسینکی پیروی کرده و با شناسه IR.TBZMED.REC.1400.894 توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تأیید قرار گرفت. در گروه بیماران، ۱۵۰ زن مبتلا به سقط خودبه‌خودی مکرر که بین سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی آذربایجان شرقی مراجعه کرده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین، گروه کنترل شامل ۱۵۰ زن سالم، زایا و بدون سابقه سقط بودند. محدوده سنی زنان بیمار بین ۲۱-۴۹ سال و محدوده سنی افراد کنترل بین ۲۲-۷۱ سال بود. بیماران مورد مطالعه دارای تجربه ۲ الی ۱۱ سقط بودند که

² tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction

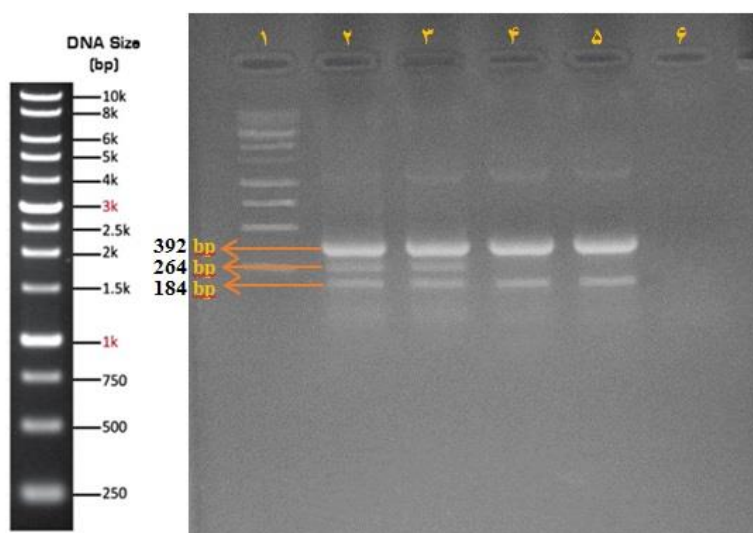
¹ Single nucleotide polymorphism

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندشکلی rs17144343 G>A HULC

SNP	اندازه محصول PCR (جفت باز)	توالی پرایمر	نام پرایمر
هر دو آل	۳۹۲	CTCTCATTATTCTGGCCCCCAGCCTG CATTCTGTACACACCAGGCTCACTGCC	رفت خارجی برگشت خارجی
G	۱۸۴	TGATTGTTGGAGTGATGTGCACAAAG	رفت داخلی
A	۲۶۴	CTTGGCCAATGCCTCAATTCCCTT	برگشت داخلی

به مدت ۶۰۰ ثانیه انجام گرفت. محصولات PCR با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ مورد بررسی قرار گرفت. از مارکر وزن مولکولی یک کیلوبازی DNA شرکت کیازیت (شماره کاتالوگ: KDNA1) برای تخمین اندازه محصولات PCR در واکنش الکتروفورز استفاده شد. در این مطالعه، قطعه ۳۹۲ جفت‌بازی توسط پرایمرهای رفت و برگشت خارجی در تمام نمونه‌ها تکثیر شد. حضور این قطعه به‌عنوان کنترل داخلی واکنش PCR، بیانگر حضور منطقه چندشکلی مورد مطالعه در نمونه‌های DNA استخراج شده و همچنین صحت انجام واکنش PCR می‌باشد. همچنین، دو قطعه کوتاه‌تر با طول‌های ۲۶۴ و ۱۸۴ جفت‌بازی به واسطه جفت شدن پرایمرهای درونی اختصاصی آلل با منطقه چندشکلی مربوطه، تکثیر یافته و به ترتیب نشانگر حضور آلل‌های A و G در نمونه‌های مورد مطالعه بودند (شکل ۱).

واکنش PCR در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر، شامل ۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X، ۰/۹ میکرولیتر آب دیونیزه، ۰/۶ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای رفت خارجی و رفت داخلی، ۰/۴ میکرولیتر از پرایمر برگشت خارجی و ۱ میکرولیتر از پرایمر برگشت داخلی انجام شد. در این واکنش، قطعه ۲۶۴ جفت‌بازی حاوی چندشکلی G>A rs17144343 HULC توسط پرایمرهای رفت خارجی و برگشت داخلی قابل تکثیر بود. چرخه‌های حرارتی واکنش PCR شامل واسرشت ابتدایی به مدت ۳۰۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۰ سیکل شامل دماهای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت شدن)، ۶۶/۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال پرایمرها) و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (پلیمریزاسیون محصول PCR) انجام شد. در نهایت، گسترش نهایی محصولات PCR دارای سنتز ناقص در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژنوتیپ‌های مختلف بر روی ژل آگارز ۲٪. چاهک ۱: مارکر 1kb اندازه مولکول DNA. چاهک‌های ۲ و ۳ نمونه‌های هتروزیگوت GA، چاهک‌های ۴ و ۵ نمونه‌های هموزیگوت GG، و چاهک ۶ کنترل منفی PCR را نشان می‌دهند. تصویر کیفی از مارکر اندازه مولکولی DNA در سمت چپ تصویر ارائه شده است.

تغییر نوکلئوتیدی یا جهش، چه تأثیری در اتصال پروتئین‌ها به RNA و الگوی پیرایشی دارد. امتیازها به صورت ۱۰- تا ۱۰+ نشان داده می‌شوند که اتصال با امتیاز مثبت، نشان‌دهنده تسهیل پیرایش آگزون و با امتیاز منفی، نشان‌دهنده تسهیل پیرایش اینترون می‌باشد.

یافته‌ها

در این مطالعه بر اساس نتایج بررسی فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی، بیشترین فراوانی مشاهده شده مربوط به ژنوتیپ GG بود که در ۱۱۳ فرد بیمار (۷۵/۳٪) و در ۱۴۷ فرد سالم (۹۸٪) تعیین شد. همچنین ۳۷ فرد بیمار (۲۴/۷٪) و ۳ فرد سالم (۲٪) دارای ژنوتیپ GA بودند. در هر دو گروه بیمار و کنترل ژنوتیپ AA مشاهده نگردید. الگوهای ژنوتیپی بر روی ژل آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج آزمون مربع کای پیرسون و فیشر، ارتباط معناداری میان فراوانی ژنوتیپ‌های GG و GA در جایگاه چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی rs17144343 بین دو گروه کنترل و بیمار وجود داشت ($p < 0/05$). در گروه کنترل، فراوانی آلل‌های A و G به ترتیب برابر با ۳ مورد (۱٪) و ۲۹۷ مورد (۹۹٪) بود، در حالی که در گروه بیمار فراوانی آلل‌های A و G به ترتیب ۳۷ مورد (۱۲/۴٪) و ۲۶۳ مورد (۸۷/۶٪) به دست آمد که بر اساس نتایج آزمون‌های مربع کای پیرسون و فیشر، میان فراوانی آلل‌های A و G در جایگاه چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی rs17144343 در دو گروه کنترل و بیمار ارتباط معناداری وجود داشت ($p < 0/001$) (جدول ۲).

بررسی آماری نتایج به صورت مقایسه‌ای بین افراد بیمار و کنترل انجام شد. برای این منظور، بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در دو گروه کنترل و بیمار با استفاده از آزمون مربع کای پیرسون و در مواردی که تعداد داده‌های مشاهده شده کمتر از ۵ بود، با استفاده از آزمون دقیق فیشر انجام شد. همچنین، قوت و شدت ارتباط بین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی rs17144343 و خطر سقط با استفاده از نسبت شانس (OR) با فاصله اطمینان (CI) ۹۵٪ محاسبه گردید. آزمون‌های آماری ذکر شده با استفاده از برنامه javastat online^۱ statistics انجام شد. برای بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و مشخصات بالینی بیماران و همچنین شاخص میانگین از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

مطالعات in silico

در این مطالعه، از پایگاه‌های داده rSNPBase^۲، HaploReg^۳، RNAsp^۴ و Splice Aid^۵ به منظور مطالعات in silico استفاده شد. rSNPBase پایگاه داده‌ای است که عناصر تنظیمی مرتبط با SNP‌های انسانی، جفت‌های ژن-عناصر تنظیمی و شبکه‌های تنظیمی مبتنی بر SNP را فراهم می‌نماید. پایگاه HaploReg، ابزاری برای کاوش تفسیر و اطلاعات ژنوم غیرکد کننده در انواع بلوک‌های هاپلوتیپ، مانند SNP‌های تنظیم‌کننده کاندید در لکوس‌های مرتبط با بیماری است. نرم‌افزار RNAsp، تغییر ساختار دوم RNA را در نتیجه چندشکلی پیش‌بینی می‌کند و نتایج را به صورت p-value ارائه می‌دهد. SpliceAid 2 نرم‌افزاری است که شامل بانک اطلاعاتی داده‌های بیانی فاکتورهای پیرایشی انسان و موتیف‌های هدف RNA می‌باشد. این نرم‌افزار نشان می‌دهد که یک

¹ Statpages 2x2 (2021). 2-by-2 table [Onlin]. Website: www.statpages.info/ctab2x2.html.

² rSNPBase (2021). rSNP search [Onlin]. Website: <http://rsnp3.psych.ac.cn/datacontent.do>.

³ HaploReg v4.1(2021). Build Query [Onlin]. Website: <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>.

⁴ RNAsp (2021). Website: <https://rth.dk/resources/rnasnp/>.

⁵ Splice Aid (2021). Website: <http://www.introni.it/splicing.html>.

جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها

ژنوتیپ	بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)	سطح معنی‌داری	OR (95% CI) OR (95% CI)
GG	۱۱۳ (۷۵/۳)	۱۴۷ (۹۸)	*p<۰/۰۰۱	۰/۰۶۲ (۰/۰۱۹-۰/۲۰۷)
GA	۳۷ (۲۴/۷)	۳ (۲)	**p<۰/۰۰۱	۱۶/۰۴۴ (۵۳/۳۶۷-۴/۸۲۴)
G	۲۶۳ (۸۷/۶)	۲۹۷ (۹۹)	*p<۰/۰۰۱	۰/۰۷۲ (۰/۲۳۶-۰/۰۲۲)
A	۳۷ (۱۲/۴)	۳ (۱)	**p<۰/۰۰۱	۱۳/۹۲۸ (۴۵/۷۰۰-۴/۲۴۵)

* آزمون مربع کای پیرسون، ** آزمون فیشر

در ادامه، ارتباط چندشکلی rs17144343 با برخی ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی مانند سن زوجین، رابطه خویشاوندی زوجین، رابطه خویشاوندی میان والدین زوجین، سابقه سقط در افراد خانواده، تعداد سقط و بیماری‌های خاص زن با استفاده از آزمون فیشر مورد ارزیابی قرار گرفت که در این بررسی، ارتباط معناداری بین نوع ژنوتیپ‌ها و وجود رابطه خویشاوندی میان والدین زوجین (p=۰/۰۰۳) به‌دست آمد (جدول ۳).

جدول ۳- ارتباط ویژگی‌های بالینی با ژنوتیپ‌های چندشکلی rs17144343

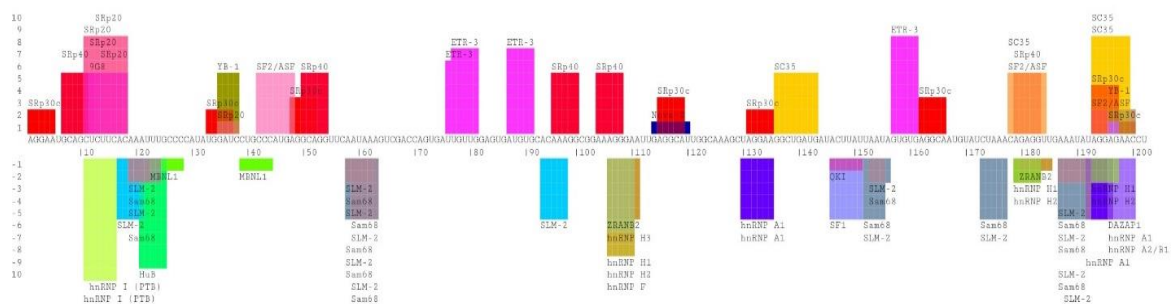
سطح معنی‌داری	ژنوتیپ		ویژگی‌های بالینی	سن
	GG	GA		
*۰/۵۵۹	۸۲	۲۵	کمتر یا مساوی ۳۵	ارتباط خویشاوندی زوجین
	۳۱	۱۲	بیشتر از ۳۵	
*۰/۲۵۳	۲۶	۱۲	دارند	ارتباط خویشاوندی والدین زوجین
	۸۷	۲۵	ندارند	
**۰/۰۰۳	۳	۵	خانواده زن ومرد	تعداد سقط
	۱۴	۰	خانواده زن	
	۱۴	۲	خانواده مرد	
	۸۲	۳۰	ندارند	
**۰/۲۷۳	۱۱	۷	خانواده زن	بیماری‌های خاص زن
	۸	۳	خانواده مرد	
	۹۴	۲۷	ندارند	
*۰/۱۱۵	۱۸	۱۰	بیشتر از ۵	جراحی و تیروئید
	۹۵	۲۷	کمتر یا مساوی ۵	
**۰/۴۷۰	۰	۱	جراحی و تیروئید	بیماری‌های خاص زن
	۲	۰	آلرژی	
	۳	۲	دیابت	
	۵	۳	جراحی	
	۴	۰	فشار بالا	
	۹	۱	چاقی	
	۹	۳	تیروئید	
	۸۱	۲۷	ندارند	

* آزمون مربع کای پیرسون، ** آزمون فیشر

PRDM1 و SETDB1 شود. همچنین، آنالیز چندشکلی rs17144343 توسط نرم‌افزار آنلاین Splice Aid2 نشان داد که پروتئین SRp30c با امتیاز ۵ به RNA در حالت جهش یافته متصل می‌شود، بنابراین نشان‌دهنده پیرایش آگزون می‌باشد (شکل ۲). بر اساس نتایج نرم‌افزار آنلاین RNAsnp نیز تغییری در ساختار دوم RNA ژن HULC بر اثر چندشکلی rs17144343 G>A مشاهده نشد (p=۰/۶۷۹۶).

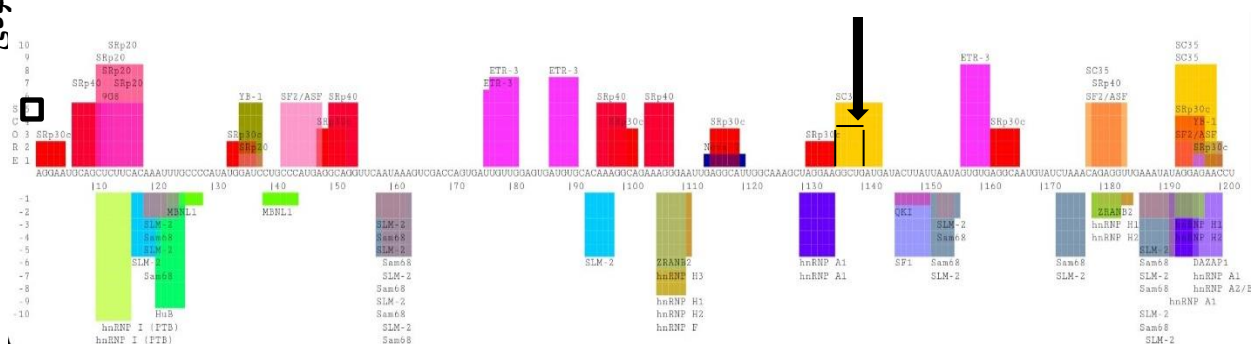
In silico آنالیز

آنالیز چندشکلی rs17144343 توسط نرم‌افزار آنلاین rSNPBase نشان داد که این چندشکلی دارای نقش تنظیمی دور و نزدیک بوده و در تنظیم بیان ژن HULC نقش دارد. نتایج حاصل از آنالیز HaploReg v4.1 برای چندشکلی مورد مطالعه نشان داد که تغییرات ناشی از این چندشکلی می‌تواند منجر به افزایش در تمایل فاکتورهای رونویسی E2F، CHD2،



اتصال پروتئین SRp30c

(الف)



(ب)

شکل ۲- تجزیه و تحلیل چندشکلی ژن HULC توسط نرم‌افزار آنلاین Splice Aid2. (الف) آل و حشی عدم اتصال به پروتئین SRp30c را نشان می‌دهد. (ب) آل جهش یافته دارای تمایل اتصال به پروتئین SRp30c با امتیاز +۵ است.

ژن، در بیشتر جمعیت‌ها فرکانس آل G بیشتر از فرکانس آل A بود. بیشترین فراوانی آل G در جمعیت‌های اروپا، آسیای جنوبی و شرقی، آمریکای لاتین، آفریقا و بیشترین فراوانی آل A در جمعیت‌های مختلف آفریقا و آسیای شرقی مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، فراوانی آل‌های A برای جمعیت محدودی از زنان ایرانی (زنان آذربایجان

فراوانی آلی گروه کنترل در مقایسه با داده‌های موجود در بانک ژن در جمعیت مختلف جهان مقایسه فراوانی آلی در جمعیت‌های مختلف جهان بر اساس داده‌های موجود در بانک ژن پایگاه NCBI¹ در جدول ۴ نشان داده شده است. بر اساس اطلاعات بانک

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

باشد. لازم به ذکر است که این مطالعه، اولین گزارش از فراوانی آللی جایگاه چندشکلی rs17144343 ژن HULC در ایران می‌باشد و احتمال دارد با مطالعه تعداد بیشتری از افراد متعلق به جمعیت ایران یا جمعیت آذربایجان شرقی، اعداد فراوانی آللی نیز تغییر یابند.

شرقی) به ترتیب برابر با ۰/۰۱ و ۰/۹۹ به دست آمد که مشابه نتایج گزارش شده برای جمعیت آسیای جنوبی (۱٪ آلل A و ۹۹٪ آلل G) می‌باشد. در مجموع، همانند بسیاری از جمعیت‌های جهان، در ایران نیز فرکانس آلل G به میزان قابل توجهی از فرکانس آلل A بیشتر می‌-

جدول ۴- فراوانی آللی به دست آمده در جمعیت مختلف جهان بر اساس داده‌های موجود در بانک ژن

مطالعه	کشور	سال	تعداد نمونه	فراوانی آلل G	فراوانی آلل A
1000Genomes	آفریقا	۲۰۱۴	۱۳۲۲	۰/۸۲۰۷	۰/۱۷۹۳
1000Genomes	آسیای شرقی	۲۰۱۴	۱۰۰۸	۰/۹۴۸۴	۰/۰۵۱۶
1000Genomes	اروپا	۲۰۱۴	۱۰۰۶	۰/۹۹۴۰	۰/۰۰۶۰
1000Genomes	آسیای جنوبی	۲۰۱۴	۹۷۸	۰/۹۷۹	۰/۰۲۱
1000Genomes	آمریکا	۲۰۱۴	۶۹۴	۰/۹۷۳	۰/۰۲۷
Allele Frequency Aggregator	اروپا	۲۰۱۸	۱۴۲۸۶	۰/۹۹۴۸۲	۰/۰۰۵۱۸
Allele Frequency Aggregator	آفریقا	۲۰۱۸	۵۵۷۰	۰/۸۱۶۲	۰/۱۸۳۸
Allele Frequency Aggregator	آفریقا	۲۰۱۸	۷۴۴	۰/۹۵۰	۰/۰۵۰
Allele Frequency Aggregator	آمریکا لاتین ۲	۲۰۱۸	۶۱۰	۰/۹۸۰	۰/۰۲۰
Allele Frequency Aggregator	آمریکا لاتین ۱	۲۰۱۸	۱۴۶	۰/۹۶۶	۰/۰۳۴
Allele Frequency Aggregator	آسیا	۲۰۱۸	۱۱۲	۰/۹۰۲	۰/۰۹۸
Allele Frequency Aggregator	آسیای جنوبی	۲۰۱۸	۹۸	۰/۹۹	۰/۰۱
gnomAD - Genomes	اروپا	۲۰۱۷	۷۵۹۵۰	۰/۹۹۳۴۷	۰/۰۰۶۵۳
gnomAD - Genomes	آفریقا	۲۰۱۷	۴۱۹۶۸	۰/۸۲۸۵۶	۰/۱۷۱۴۴
gnomAD - Genomes	آمریکا	۲۰۱۷	۱۳۶۵۸	۰/۹۸۱۱۸	۰/۰۱۸۸۲
gnomAD - Genomes	بهبودی اشکنازی	۲۰۱۷	۳۳۲۲	۰/۹۹۴۰	۰/۰۰۶۰
gnomAD - Genomes	آسیای شرقی	۲۰۱۷	۳۱۲۸	۰/۹۴۶۳	۰/۰۵۳۷
gnomAD - Genomes	آسیای شرقی	۲۰۱۷	۲۱۵۰	۰/۹۴۵۶	۰/۰۵۴۴
HapMap	آمریکا	۲۰۰۳	۱۲۰	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰
HapMap	آفریقا	۲۰۰۳	۱۰۸	۰/۷۰۴	۰/۲۹۶
HapMap	آسیا	۲۰۰۳	۸۸	۰/۹۵	۰/۰۵
-	ایران	۲۰۰۳	۱۵۰	۰/۹۹	۰/۰۱

rs1328868 rs3005167 rs7770772
و rs7763881 rs7637172 rs2038540
rs17144343 گزارش شده است (۴۵).

با توجه به غیررمزگذار بودن رونوشت‌های ژن HULC و عملکردهای متنوع RNAهای غیررمزگذار، تنوع برهم‌کنش‌ها و عملکردهای متعدد برای این ژن نیز همانند سایر RNAهای غیررمزگذار قابل انتظار است که مطالعات مختلف بر روی این ژن در انواع بیماری‌ها، مؤید این موضوع می‌باشد. در ادامه به برخی از این مطالعات اشاره می‌گردد.

بحث

سقط خودبه‌خودی مکرر به معنای حداقل ۳ بار سقط خودبه‌خودی تا قبل از هفته بیستم بارداری یا تولد جنین با وزن کم‌تر از ۵۰۰ گرم است که در حدود ۱/۴-۰/۸٪ زوجین مشاهده می‌شود (۴۳). این عارضه، یک بیماری چندعاملی به‌شمار می‌رود که نقش مجموعه‌ای از عوامل محیطی و ژنتیکی در ایجاد آن شناسایی شده است (۴۳). ژن HULC lncRNA اولین بار به‌عنوان یک نشانگر مولکولی بسیار مهم در سرطان کبد کشف شد (۴۴) و تاکنون ۸ چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی دارای عملکرد مؤثر در این ژن شامل rs1041279

مکرر دارد. همچنین مشخص شده است که سلول‌های تروفوبلاستیک تحت EMT قرار می‌گیرند و به تروفوبلاست‌های مزانشیمی تبدیل می‌شوند که پیش‌نیاز تهاجم و مهاجرت آنهاست (۴۷). این یافته‌ها می‌تواند بخشی از نقش احتمالی ژن HULC را در پاتوژنز سقط خودبه‌خودی مکرر توجیه نماید، ولی با توجه به محدود بودن مطالعات بر روی ژن HULC در سقط خودبه‌خودی مکرر، شناسایی نقش دقیق رونوشت‌های این ژن در ارتباط با سقط، نیازمند مطالعات و داده‌های بیشتری می‌باشد.

در بررسی ارتباط چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی با سقط خودبه‌خودی مکرر، چندین مطالعه تحقیقاتی در چین نشان دادند که چندشکلی در ژن‌های lncRNA^۱، MALAT1^۳، CCAT2^۴ و HULC^۵ دارای ارتباط با استعداد ابتلاء به سقط خودبه‌خودی مکرر هستند (۲۳-۲۶). همچنین فانگ و همکاران (۲۰۱۹)، چندشکلی rs17144343 ژن HULC را در افراد مبتلا به سقط خودبه‌خودی با استفاده از روش Taq Man مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که این چندشکلی همراهی معنی‌داری با سقط خودبه‌خودی دارد (۴۲).

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری میان چندشکلی rs17144343 G>A ژن HULC با سقط خودبه‌خودی مکرر در جمعیت زنان آذربایجان شرقی به‌دست آمد که با نتایج تحقیقات پیشین در این زمینه مطابقت داشت.

نتایج این مطالعه، فراوانی بالای ژنوتیپ هموزیگوت GG نسبت به ژنوتیپ هتروزیگوت GA را در هر دو گروه افراد مبتلا به سقط مکرر و افراد سالم مشخص نمود. با وجود اینکه مطالعه انجام شده بر روی زنان چینی ارتباط معناداری میان ژنوتیپ هموزیگوت AA و سقط مکرر نشان داده بود، اما در مطالعه حاضر، ژنوتیپ هموزیگوت AA در هیچ‌کدام از دو گروه بیمار و سالم مشاهده نشد که علت آن می‌تواند کوچکی جمعیت مورد مطالعه باشد.

مطالعه پنگ و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که کاهش بیان lncRNA^۱ HULC در بیماران مبتلا به سرطان پانکراس منجر به پیشرفت بیماری می‌گردد (۳۳). همچنین وانگ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که افزایش HULC در سرطان پستان علاوه بر تأثیر بر تکثیر، تهاجم و متاستاز می‌تواند بر LYPD1 اثر گذارد و به پیشرفت سرطان منجر شود (۴۰). مطالعه یانگ و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که HULC در تومورهای سرطان روده بزرگ (CRC)^۱ مجدداً تنظیم می‌گردد و با خاموش کردن بیان سرکوبگر تومور NKD2، به پیشرفت CRC و متاستاز منجر می‌شود (۴۱). چن و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه بر روی بیماران مبتلا به سرطان اپیتلیال تخمدان نشان دادند که بیان بیش از حد HULC از طریق کاهش بیان LC3-II، ATG7 و LAMP1 و افزایش بیان SQSTM1 (P62) و ITGB1 به تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم منجر می‌گردد (۲۹). سان و همکاران (۲۰۱۵)، با بررسی نقش HULC در بیماری استئوسارکوما نشان دادند که افزایش بیان HULC می‌تواند به‌عنوان نشانگرضعیفی در این بیماری مورد توجه قرار گیرد (۲۸). در مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که افزایش بیان HULC در سرطان مثانه از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ PI3K، AKT و ZIC2 منجر به زنده ماندن سلول‌ها شده و از آپوپتوز جلوگیری می‌کند (۳۰). مطالعه یان و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی بیماران گلیوما صورت گرفت، نشان داد که افزایش بیان HULC منجر به افزایش تکثیر سلولی و تشکیل کلونی سلول‌های گلیوما U87 می‌شود (۳۱). لیو و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که افزایش بیان HULC منجر به تسریع تکثیر، تهاجم و فنوتیپ گذر از حالت اپیتلیال به مزانشیم (EMT) می‌گردد و آپوپتوز سلول‌های سرطان معده (GC)^۲ را سرکوب می‌کند (۴۶).

در ارتباط با سقط جنین، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عملکردهای تهاجم و مهاجرت سلول‌های خارج پرزی تروفوبلاست، ارتباط نزدیکی با وقوع سقط خودبه‌خودی

³ Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

⁴ colon cancer associated transcript 2

⁵ Highly up-regulated in liver cancer

¹ colorectal cancer

² gastric cancer

در مقابل، ارتباط معنی‌داری میان ژنوتیپ GA و سقط مکرر به‌دست آمد ($p=0/000$) که نشان‌دهنده ارتباط آلل A با استعداد بروز سقط مکرر بوده و با نتایج تحقیقات قبلی سازگار است.

در مطالعه حاضر بر اساس نتایج آزمون‌های مربع کای پیرسون و فیشر، آلل G دارای فراوانی بیشتر (تعداد ۲۶۳ آلل در گروه مبتلا و تعداد ۲۹۷ آلل در گروه سالم) و آلل A دارای فراوانی کمتر (تعداد ۳۷ آلل در گروه مبتلا و تعداد ۳ آلل در گروه سالم) در هر دو گروه افراد مبتلا و سالم بود. همچنین در مقایسه فراوانی آلل A در بین دو گروه، ارتباط معنی‌داری میان حضور آلل A و استعداد سقط خودبه‌خودی مکرر نشان داد ($p<0/05$). لازم به ذکر است که این مطالعه، اولین گزارش از فراوانی آللی ژن $HULC$ در جمعیت ایران بوده و فراوانی‌های آللی به‌دست آمده در این مطالعه با فراوانی‌های گزارش شده برای اکثر جمعیت‌های دنیا در بانک ژن تشابه نشان می‌دهد، اما با توجه به محدود بودن تعداد افراد در این مطالعه، تعیین فراوانی آللی در یک نمونه جمعیتی بزرگ‌تر می‌تواند داده‌های معتبرتری را فراهم نماید.

در این مطالعه بر اساس نتایج آزمون فیشر در بررسی ارتباط این چندشکلی با برخی ویژگی‌های بالینی و آسیب‌شناختی، بین ژنوتیپ‌ها و رابطه خویشاوندی والدین زوجین ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0/003$)، درحالی‌که در سایر ویژگی‌ها ارتباط معناداری به‌دست نیامد.

در این مطالعه آنالیزهای *In silico* مختلفی بر روی اثرات چندشکلی $G>A$ rs17144343 در برهم‌کنش‌های مولکولی انجام شد که نتایج زیر به‌دست آمد:

۱. نرم‌افزار rSNPBase نشان داد چندشکلی $G>A$ rs17144343 با داشتن نقش تنظیمی دور و نزدیک، در تنظیم بیان ژن $HULC$ نقش دارد.

۲. در نرم‌افزار RNAsnp تغییرات ساختار فضایی با $p<0/2$ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته می‌شود. برای چندشکلی مورد مطالعه، p -value بیشتر از $0/2$ بود و طبق پیش‌بینی نرم‌افزار RNAsnp، تغییری در ساختار دوم RNAی $HULC$ در اثر چندشکلی $G>A$ rs17144343 ایجاد نمی‌شود. همچنین کمینه

انرژی به‌دست آمده برای آلل‌های وحشی و جهش‌یافته نشان داد که تفاوتی در پایداری RNAهای وحشی و جهش‌یافته وجود ندارد.

۳. نتایج آنالیز با استفاده از نرم‌افزار HaploReg v4.1 نشان داد که چندشکلی rs17144343 می‌تواند منجر به تغییر در تمایل اتصال چهار فاکتور رونویسی CHD2، E2F، PRDM1 و SETDB1 به ناحیه موردنظر بر روی ژن $HULC$ شود.

۴. آنالیز حاصل از نرم‌افزار SpliceAid2 نشان داد که در اثر جهش، پیرایش اگزون، با اتصال پروتئین SRp30c به توالی AGGAA موجود در RNA (نوکلئوتیدهای ۴۸-۵۲) در موقعیت +۵ به وقوع می‌پیوندد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری میان چندشکلی $G>A$ rs17144343 در ژن $HULC$ با استعداد سقط خودبه‌خودی مکرر در جمعیت زنان آذربایجان شرقی به‌دست آمد. با وجودی‌که ژنوتیپ AA در هیچ یک از افراد بیمار و گروه کنترل مشاهده نشد، اما فراوانی ژنوتیپ GA و فراوانی آلل A در گروه بیماران به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه کنترل بود. بنابراین نتایج این مطالعه، همراهی معنی‌داری میان آلل A در جایگاه چندشکلی rs17144343 ژن $HULC$ با سقط خودبه‌خودی مکرر را نشان داد. همچنین فراوانی آللی به‌دست آمده در این مطالعه بسیار نزدیک به فراوانی آللی سایر جمعیت‌های دنیا می‌باشد.

مطالعات *in silico* با نرم‌افزارهای مختلف، اثرات احتمالی جایگزینی آلل A را به‌جای آلل G بر روی برهم‌کنش مولکولی رونوشت‌های $HULC$ با سایر عوامل تنظیمی مولکولی مشخص نمود. اثرات پیش‌بینی شده در آنالیزهای *in silico* می‌تواند به‌عنوان توجیهی برای نقش احتمالی این ژن در سقط خودبه‌خودی به‌شمار رود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات کارکنان مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی تبریز به‌ویژه سرکار خانم حوریه خانی، تشکر و قدردانی می‌شود.

- Baek KH, Lee EJ, Kim YS. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends in molecular medicine* 2007; 13(7):310-7.
- Magnus MC, Wilcox AJ, Morken NH, Weinberg CR, Håberg SE. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *bmj* 2019; 364.
- Gabbai D, Harlev A, Friger M, Steiner N, Sergienko R, Kreinin A, et al. Pregnancy outcomes among patients with recurrent pregnancy loss and uterine anatomic abnormalities. *Journal of Perinatal Medicine* 2018; 46(7):728-34.
- Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in obstetrics and gynecology* 2009; 2(2):76.
- Africa CW, Nel J, Stemmet M. Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonisation. *International journal of environmental research and public health* 2014; 11(7):6979-7000.
- Bonyadi M, Yasari S, Taghavi S. Association Study of Gsto1 Gene E155del Polymorphism Among Patients with Recurrent Miscarriage from Northwest of Iran. *Studies in Medical Sciences* 2015; 26(4):320-6.
- Mahmoudabadi FS, Ziaei S, Firoozabadi M, Kazemnejad A. Use of mobile phone during pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2015; 13:1-4.
- Arachchillage DR, Makris M. Reply to comment on: inherited thrombophilia and pregnancy complications: should we test?. In *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2019; 45(5):555-556. Thieme Medical Publishers.
- Sah AK, Shrestha N, Joshi P, Lakha R, Shrestha S, Sharma L, et al. Association of parental methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *BMC research notes* 2018; 11(1):1-5.
- Jivraj S, Makris M, Saravelos S, Li TC. Pregnancy outcome in women with factor V Leiden and recurrent miscarriage. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2009; 116(7):995-8.
- Adler G, Mahmutbegovic E, Valjevac A, Adler MA, Mahmutbegovic N, Safranow K, et al. Association between-675 ID, 4G/5G PAI-1 gene polymorphism and pregnancy loss: a systematic review. *Acta Informatica Medica* 2018; 26(3):156.
- Su MT, Lin SH, Chen YC, Kuo PL. Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss. *Thrombosis and haemostasis* 2013; 109(01):8-15.
- Jalili M, Asadollahi S, Seifati SM, Ashrafzadeh HR, Ghasemi N. Investigation of the association between eNOS gene promoter polymorphism (-786 T> C) and idiopathic recurrent pregnancy loss in Iranian women; 2020.
- Azzam OA, Mahgoub SS, Farhan SS. Is there an Association Between-2549 Insertion/Deletion Polymorphisms in the Promotor Region of the Gene Encoding for VEGFA as a Risk Factor and the Idiopathic Recurrent Spontaneous Miscarriage in a Sample of Jordanian Women. *Prensa Med Argent (Genetics)* 2020; 106:3.
- Elenis E, Lindgren KE, Karypidis H, Skalkidou A, Hosseini F, Bremme K, et al. The histidine-rich glycoprotein A1042G polymorphism and recurrent miscarriage: a pilot study. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014; 12(1):1-7.
- Fan QE, Zhang J, Cui Y, Wang C, Xie Y, Wang Q, et al. The synergic effects of CTLA-4/Foxp3-related genotypes and chromosomal aberrations on the risk of recurrent spontaneous abortion among a Chinese Han population. *Journal of human genetics* 2018; 63(5):579-87.
- Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *The American Journal of Human Genetics* 2003; 72(6):1425-35.
- Najafi N, Ali-Reza A, Hajihosseini R, Khodaverdi S, Mohammadi A. Protective Role of ADA* 2 Allele of the Adenosine Deaminase Gene Against Recurrent Spontaneous Abortions in Iranian Women. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2019; 21(7).
- Li J, Chen Y, Mo S, Nai D. Potential Positive Association between Cytochrome P450 1A1 Gene Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss: a Meta-Analysis. *Annals of Human Genetics* 2017; 81(4):161-73.
- Koutsothanassis C, Agiannitopoulos K, Georgoutsou M, Bampali K, Hatzaki A, Lamnissou K. Genetic variant in the CYP19 gene and recurrent spontaneous abortions. *Gene Reports* 2017; 6:41-3.
- Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, Calin GA. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?. *Oncogene* 2012; 31(43):4577-87.
- Aznaourova M, Schmerer N, Schmeck B, Schulte LN. Disease-causing mutations and rearrangements in long non-coding RNA gene loci. *Frontiers in genetics* 2020; 11:527484.
- Cheng J, Meng J, Zhu L, Peng Y. Exosomal noncoding RNAs in Glioma: biological functions and potential clinical applications. *Molecular cancer* 2020; 19:1-14.
- Lu Y, Li Y, Chai X, Kang Q, Zhao P, Xiong J, et al. Long noncoding RNA HULC promotes cell proliferation by regulating PI3K/AKT signaling pathway in chronic myeloid leukemia. *Gene* 2017; 607:41-6.
- Che DI, Yang Y, Xu Y, Fang Z, Pi L, Fu L, et al. The lncRNA MALAT1 rs619586 G variant confers decreased susceptibility to recurrent miscarriage. *Frontiers in Physiology* 2019; 10:385.

26. Che D, Huang W, Fang Z, Li L, Wu H, Pi L, et al. The lncRNA CCAT2 rs6983267 G allele is associated with decreased susceptibility to recurrent miscarriage. *Journal of Cellular Physiology* 2019; 234(11):20577-83.
27. Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology* 2007; 132(1):330-42.
28. Sun XH, Yang LB, Geng XL, Wang R, Zhang ZC. Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015; 8(3):2994.
29. Chen S, Wu DD, Sang XB, Wang LL, Zong ZH, Sun KX, et al. The lncRNA HULC functions as an oncogene by targeting ATG7 and ITGB1 in epithelial ovarian carcinoma. *Cell Death & Disease* 2017; 8(10):e3118-.
30. Wang J, Ma W, Liu Y. Long non-coding RNA HULC promotes bladder cancer cells proliferation but inhibits apoptosis via regulation of ZIC2 and PI3K/AKT signaling pathway. *Cancer Biomarkers* 2017; 20(4):425-34.
31. Yan H, Tian R, Zhang M, Wu J, Ding M, He J. High expression of long noncoding RNA HULC is a poor predictor of prognosis and regulates cell proliferation in glioma. *OncoTargets and therapy* 2017; 10:113.
32. Yang J, Yin Z, Li Y, Liu Y, Huang G, Gu C, et al. The identification of long non-coding RNA H19 target and its function in chronic myeloid leukemia. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2020; 19:1368-78.
33. Peng W, Gao W, Feng J. Long noncoding RNA HULC is a novel biomarker of poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Medical oncology* 2014; 31:1-7.
34. Zhou W, Chen L, Li C, Huang R, Guo M, Ning S, et al. The multifaceted roles of long noncoding RNAs in pancreatic cancer: an update on what we know. *Cancer Cell International* 2020; 20:1-11.
35. Kang M, Sang Y, Gu H, Zheng L, Wang L, Liu C, et al. Long noncoding RNAs POLR2E rs3787016 C/T and HULC rs7763881 A/C polymorphisms are associated with decreased risk of esophageal cancer. *Tumor Biology* 2015; 36:6401-8.
36. Ma J, Xiao Y, Tian B, Chen S, Zhang B, Wu J, et al. Genome-wide analyses of long non-coding RNA expression profiles and functional network analysis in esophageal squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 2019; 9(1):9162.
37. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic acids research* 2010; 38(16):5366-83.
38. Ou ZL, Luo Z, Lu YB. Long non-coding RNA HULC as a diagnostic and prognostic marker of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology* 2019; 25(46):6728.
39. Xian HP, Zhuo ZL, Sun YJ, Liang B, Zhao XT. Circulating long non-coding RNAs HULC and ZNF1-AS1 are potential biomarkers in patients with gastric cancer. *Oncology letters* 2018; 16(4):4689-98.
40. Wang N, Zhong C, Fu M, Li L, Wang F, Lv P, et al. Long non-coding RNA HULC promotes the development of breast cancer through regulating LYPD1 expression by sponging miR-6754-5p. *OncoTargets and therapy* 2019; 12:10671.
41. Yang XJ, Huang CQ, Peng CW, Hou JX, Liu JY. Long noncoding RNA HULC promotes colorectal carcinoma progression through epigenetically repressing NKD2 expression. *Gene* 2016; 592(1):172-8.
42. Fang Z, Yang Y, Xu Y, Mai H, Zheng W, Pi L, et al. LncRNA HULC polymorphism is associated with recurrent spontaneous abortion susceptibility in the Southern Chinese population. *Frontiers in Genetics* 2019; 10:918.
43. Cao C, Bai S, Zhang J, Sun X, Meng A, Chen H. Understanding recurrent pregnancy loss: recent advances on its etiology, clinical diagnosis, and management. *Medical Review*; 2022.
44. Wang Y, Chen F, Zhao M, Yang Z, Li J, Zhang S, et al. The long noncoding RNA HULC promotes liver cancer by increasing the expression of the HMGA2 oncogene via sequestration of the microRNA-186. *Journal of Biological Chemistry* 2017; 292(37):15395-407.
45. Wang BG, Lv Z, Ding HX, Fang XX, Wen J, Xu Q, et al. The association of lncRNA-HULC polymorphisms with hepatocellular cancer risk and prognosis. *Gene* 2018; 670:148-54.
46. Liu T, Liu Y, Wei C, Yang Z, Chang W, Zhang X. LncRNA HULC promotes the progression of gastric cancer by regulating miR-9-5p/MYH9 axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2020; 121:109607.
47. Li S, Zhai J, Liu J, Hong Y, Zhao W, Zhao A, et al. BMAL1 facilitates trophoblast migration and invasion via SP1-DNMT1/DAB2IP pathway in recurrent spontaneous abortion. *Oncotarget* 2017; 8(52):89451-64.