

بررسی اثر جایگزینی miRNA-145 در مهار مهاجرت در سرطان ریه رده سلولی A549

نواز صادقیه^۱، بهزاد برادران^{۲*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سرطان ریه یکی از سرطان‌های رایج و دلیل اصلی مرگ به علت سرطان در مردان است و دومین دلیل مرگ به علت سرطان در زنان است. در این تحقیق ما با جایگزینی miRNA-145 در سلول‌های سرطان ریه از طریق انتقال ژن miRNA-145 توسط وکتور، بیان این miRNA را در این سلول‌ها افزایش دادیم و اثرات این miRNA را در مهار متاستاز بررسی کردیم. **مواد و روش کار:** بعد از کشت سلول‌های سرطانی A549 با استفاده از تست MTT، IC50 آنتی‌بیوتیک Gentamicin (G418) را در این رده سلولی به دست آوردیم. در ادامه با استفاده از JetPAI انتقال miRNA-145 به داخل سلول‌های سرطان ریه صورت گرفت. از تست qRT-PCR برای تأیید عمل انتقال miRNA-145 به داخل سلول‌ها استفاده شد. تست Wound healing برای بررسی وضعیت مهاجرت سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های کنترل استفاده گردید. **یافته‌ها:** با استفاده از تست IC50.MTT به دست آمده برای آنتی‌بیوتیک Genetecin ۴۹۴.۱ µg/ml شد. نتایج حاصل از تست qRT-PCR افزایش بیان miRNA-145 را در سلول‌های A549 ترانسفکت شده نشان داد. در نهایت نتایج تست Wound healing کاهش مهاجرت سلول‌های ترانسفکت شده را در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان داد. **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده نشان داد که افزایش miRNA-145 در کاهش متاستاز سلول‌های سرطان ریه رده سلولی A549 نقش دارد. **کلیدواژه‌ها:** miRNA، سرطان ریه، متاستاز، ترانسفکت

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره پنجم، ص ۳۳۱-۳۲۱، مرداد ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، تلفن: ۴۱۳۳۳۷۱۴۴۰

Email: Behzad_im@yahoo.com

مقدمه

کلی نامساعد است و بسیاری از بیماران در عرض چند ماه بعد از تشخیص از دنیا می‌روند (۴). سرطان ریه یکی از سرطان‌های رایج و دلیل اصلی مرگ به علت سرطان در مردان است و دومین دلیل مرگ به علت سرطان در زنان است. ۱.۶ میلیون مورد سرطان ریه هر سال در سراسر جهان دیده می‌شود و ۱.۴ میلیون مرگ هر ساله از سرطان ریه گزارش شده است. سرطان ریه معمولاً در سنین بالا دیده می‌شود (۵). miRNA ها زیرگروه بزرگی از RNA ها هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند. این مولکول‌ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA ها یا القا تجزیه آن‌ها کنترل می‌کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه 3'-UTR انتهای mRNA انجام می‌دهند. ساخته شدن miRNA ها در هسته و

سرطان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامتی جوامع امروزی است. در سلول‌های سرطانی DNA آسیب می‌بیند و این آسیب ترمیم نمی‌شود و سلول‌های تازه‌ای که بدن به آن نیاز ندارد را می‌سازد (۱، ۲). سرطان ریه نوعی بیماری است که مشخصه آن رشد کنترل نشده سلول در بافت‌های ریه است. اگر این بیماری درمان نشود، رشد سلولی می‌تواند در یک فرایند به نام متاستاز به بیرون از ریه گسترش پیدا کند و به بافت‌های اطراف یا سایر اعضای بدن برسد (۳).

متأسفانه، بسیاری از بیماران مبتلا به سرطان ریه در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شود و اگرچه داروهای جدید زیرمجموعه‌های کوچک از این بیماران را بهبود بخشیده ولی بقای

^۱ گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

^۲ گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

^۳ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

وسيله‌ای برای اصلاح بیولوژی تومور و در نتیجه تغییر پیامدهای بالینی باشد. چند استراتژی برای دست‌کاری miRNA ها در داخل بدن تحت بررسی می‌باشد که یکی از این روش‌ها جایگزینی miRNA در سلول‌های سرطانی می‌باشد. شواهدی مبنی بر اینکه تنظیم پروتئین‌های درگیر در مسیر مهم پاتوژن سرطان ریه نیز توسط miRNA ها تنظیم می‌شود وجود دارد (۴).

miRNA های متعددی با ویژگی ضد توموری در سرطان ریه معرفی و مطالعه شده‌اند. یکی از آن‌ها miRNA-145 می‌باشد که کاهش بیان آن در بسیاری از انواع سرطان‌ها گزارش شده است. اولین گزارش، از مایکل و همکاران، بیان پایین miRNA-145 در آدنوکارسینومای کولون در مقایسه آن با مخاط مشاهده شد (۲۲). miRNA-145 روی کروموزوم شماره ۵ واقع شده است که یک ناحیه شکننده در ژنوم می‌باشد، این miRNA برای اولین بار در موش شناسایی شد و بعد از مدت کوتاهی در انسان نیز شناسایی گردید. miRNA-145 به‌عنوان تنظیم‌کننده مهم و اساسی در بیان ژن مطرح است (۲۳).

در بیشتر سرطان‌ها از جمله پروستات، سینه، کولون، کبد و تخمدان کاهش بیان miRNA-145 گزارش شده است (۲۲). از آنجاکه کاهش بیان در سرطان ریه باعث افزایش تکثیر و متاستاز و کاهش آپوپتوز می‌شود، می‌توان این miRNA را به‌عنوان یک هدف درمانی برای سرطان ریه مطرح نمود و در اینجا روش جدیدی به نام miRNA Replacement therapy مطرح می‌شود که در این روش با جایگزینی miRNA در سلول‌های سرطانی از طریق ترانسفکت ژن miRNA موردنظر توسط وکتور، می‌توان بیان miRNA را در سلول‌های سرطانی به سطح طبیعی بازگرداند و موردنظر بیان ژن‌های هدف خود را به‌صورت طبیعی تنظیم نماید (۲۴، ۲۵).

در این تحقیق هدف ما جایگزینی miRNA-145 در سلول‌های سرطانی A549 و بررسی اثر این miRNA بر میزان متاستاز این رده سلولی بود.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

ابتدا سلول‌های سرطانی ریه رده سلولی A549 از انبستیتویاستور ایران خریداری و آن‌ها را در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco, USA) غنی‌شده با ۱۰ درصد Fetal Bovin Serum (FBS) (Gibco, USA) و استریل شده به‌وسیله فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب حاوی 5% CO2 در فلاسک های 25ml کشت داده شد.

سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. Pri-miRNA توسط RNAPOLII رونویسی می‌شود، Pri-miRNA ساختار سنجاق‌سری stem-loop داشته که دارای دم poly A در انتهای 3' و کلاهک CAP در انتهای 5' می‌باشد. Pri-miRNA ابتدا در هسته توسط RNaseIII (Drosha) به Pre-miRNA تبدیل می‌شود و بعد به سیتوپلاسم منتقل می‌شود، در سیتوپلاسم، توسط RNaseIII دیگری به نام Dicer پردازش نهایی miRNA انجام می‌گیرد. miRNA ها از نظر عملکردی در سلول‌ها به دودسته‌ی تومورسپرسور و انکوژن تقسیم می‌شوند (۶-۸).

حدود ۵۳۰۰ ژن انسان به‌عنوان هدف برای میکرو RNA دخالت دارند، که آن‌ها را یکی از فراوان‌ترین کلاس‌های ژن‌های نظارتی در انسان کرده است (۹). به دنبال کشف میکرو RNA ها در پستانداران و مطالعاتی که در مورد نقش این مولکول‌ها در سرطان انجام گرفت دو واقعیت مهم به اثبات رسید، اول این‌که میکرو RNA ها در سرطان بیان متفاوتی دارند و دوم تغییر بیان میکرو RNA در هر نوع تومور علائم منحصر به فردی را ایجاد می‌کند (۱۰-۱۳).

با توجه به نوع تغییر بیان میکرو RNA ها در سلول‌های سرطانی، آن‌ها را به دو گروه انکوژنیک و سرکوب‌کننده تومور طبقه‌بندی کرده‌اند. بیان میکرو RNA های انکوژن در سلول‌های توموری افزایش می‌یابد (۱۴، ۱۵). در مقابل، میکرو RNA های سرکوب‌کننده تومور در سلول‌های توموری کاهش بیان نشان می‌دهند (۱۶، ۱۷).

علت تنظیم نادرست میکرو RNA ها در بافت‌های توموری می‌تواند در نتیجه جهش، تغییرات اپی ژنتیک، حذف ژنومی و یا تغییر در پردازش میکرو RNA باشد. بیان نادرست میکرو RNA به‌صورت اولیه و یا سرکوب یک میکرو RNA می‌تواند به‌صورت مؤثر در تومور زایی و یا پیشرفت تومور نقش داشته باشد (۱۸-۲۰).

علاوه بر کمک به توسعه و عملکرد طبیعی، miRNA ها کاربردهایی در بیماری‌های مختلف دارند. با توجه به اهمیت miRNA ها در تنظیم تمایز سلولی و تکثیر، تعجب‌آور نیست که تنظیم اشتباهی آن‌ها به سرطان مرتبط باشد (۹).

مهاجرت سلولی و تهاجم از ویژگی‌های اصلی سلول‌های تومور متاستاتیک که مسئول مرگ ناشی از سرطان هستند؛ به‌خوبی شناخته‌شده است که پتانسیل یک سلول تومور برای متاستاز بستگی به عوامل متعدد دارد. شواهد نشان می‌دهد که miRNA ها می‌تواند بازیگران اصلی در تنظیم حمله سلول‌های تومور و متاستاز باشند (۲۱).

نقش miRNA ها در تنظیم مسیر سرطانی باعث می‌شود که آن‌ها اهداف مناسبی برای درمان سرطان باشند. به‌صورت مصنوعی افزایش و یا کاهش فراوانی miRNA های اختصاصی ممکن است

تست MTT جهت تعیین IC_{50} دوز مناسب آنتی‌بیوتیک (G-418) Geneticin:

در این آزمایش از نمک زرد رنگ تترازولیوم استفاده می‌گردد، به طوری که ابتدا تعداد ۱۵۰۰۰ سلول A549 را همراه با محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاو ۱۰ درصد در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی (U buttum) توزیع نموده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از پودر آنتی‌بیوتیک Geneticin (Gibco, USA) محلول 100 mg/ml تهیه شده و برای working ۱۰ برابر رقیق شد. برای افزایش دقت آزمایشات، افزودن هر دوز از آنتی‌بیوتیک به صورت Triplicate (سه تایی) صورت گرفت. بعد از اضافه کردن آنتی‌بیوتیک پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ۷۲ ساعت بعد محیط رویی به آرامی جمع‌آوری و دور ریخته شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر PBS (Gibco, USA) جهت شستشو اضافه کرده و سپس PBS دور ریخته شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از محلول MTT (Bio Basic, Canada) همراه با ۱۰۰ μ L از محیط کشت کامل (RPMI1640 و سرم جنین گاو ۱۰ درصد) به هر چاهک افزوده و ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد و پس از سپری شدن زمان انکوباسیون (۴ ساعت)، محلول رویی را به آرامی خارج کرده و سپس ۲۰۰ μ L از دی متیل سولفوکسید (DMSO) (AppliChem, Germany) Dimethylsulfoxid به همراه ۲۵ از بافر سورنسون به هر چاهک افزوده گردید و این بار به مدت ۳۰ دقیقه پلیت را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده و پس از ۳۰ دقیقه، پلیت را در دستگاه الیزا ریدر ELISA Reader (Tecon, Sunrise, Austria) قرار داده و تغییر رنگ چاهک‌ها با طول موج ۵۷۰/۶۳۰ nm سنجیده شد.

جایگزینی:

با توجه به پروتکل ترنسفکت در دو میکروتیوب به صورت جداگانه مقدار ۶ μ L محلول Jetpei (Polyplus, France) ریخته و با ۹۴ μ L محلول 150mM NaCl (Polyplus, France) استریل شده به حجم 100 μ L رساندیم، در میکروتیوب دیگر DNA و کتور حامل ژن miRNA-145 تحت عنوان Vec+ خریداری شده (Expression plasmid for human microRNA-MIR145) (Origene, USA) اضافه نمودیم، با توجه به اینکه غلظت توصیه شده و کتور برای انجام ترنسفکت ۶۰۰۰ است و غلظت DNA و کتور حاوی ژن miRNA-145 توسط دستگاه NanoDrop (ThermoScientific, 2000c, USA) اندازه‌گیری گردید سپس با محلول NaCl به حجم 100 μ L رساندیم. پس از آن محتویات دو

میکروتیوب که یکی حاوی Jetpei و NaCl و دیگری حاوی DNA و کتور مورد نظر و NaCl می‌باشد را به هم اضافه کردیم و مدت نیم ساعت تحت تاریکی در دمای اتاق انکوبه کردیم و پس از گذشت نیم ساعت مورد نیاز محتویات میکروتیوب حاوی Jetpei و DNA و کتورهای حاوی ژن miRNA-145 که 200 μ L می‌باشد به سلول‌های یکی از خانه‌های پلیت ۶ خانه‌ای اضافه کردیم و به خانه دوم که جهت کنترل می‌باشد 1ml محیط کشت RPMI با FBS 10% اضافه کردیم.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت پلیت حاوی سلول‌ها کنترل شد و محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک با محیط کشت RPMI حاوی FBS 20% و حاوی آنتی‌بیوتیک تعویض شد. با توجه به آنکه وکتورها حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Geneticin می‌باشد لذا برای گزینش سلول‌های دریافت‌کننده و کتور مورد نظر 50mg/ml آنتی‌بیوتیک Geneticin (Gibco, USA) به خانه‌های پلیت حاوی سلول‌های ترنسفکت شده اضافه کردیم و طبق پروتکل تعویض محیط کشت و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک تا گزینش کامل سلول‌ها ادامه یافت.

پس از گذشت ۱ هفته و مرگ سلول‌های فاقد وکتور حاوی ژن miRNA-145 در اثر آنتی‌بیوتیک و افزایش سلول‌های دریافت‌کننده و کتور حاوی ژن miRNA-145 که مقاوم به این آنتی‌بیوتیک هستند، سلول‌های موجود در پلیت پس از رسیدن به حدنصاب و پر کردن کامل کف پلیت از پلیت‌ها ترپسینه و جدا شده و به فلاسک‌های 25ml انتقال داده شدند و همانند پلیت‌ها مراحل تعویض محیط و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک طبق پروتکل روزانه تا ۱۴ روز ادامه دادیم.

استخراج miRNA:

ابتدا از سلول‌های کنترل و ترانسفکت شده رسوب سلولی به دست آوردیم، به هر فالتکون حاوی رسوب سلولی 1ml محلول GeneAll, Republic of Korea) RiboEx اضافه کردیم، سپس آن‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم، پس از ۱۰ دقیقه 0.5ml محلول Chloroform reinst (Merck, Germany) به سلول‌ها اضافه کردیم سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور 12000rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌فریوژ کردیم، این عمل باعث جدا شدن محتوی سلول‌ها از یکدیگر بر اساس شیب غلظت و وزن مولکولی می‌شود، پس از اتمام سانتی‌فریوژ در میکروتیوب‌ها سه لایه قابل تشخیص است که لایه شفاف بالایی را با سمپلر و با دقت جدا نموده و به یک میکروتیوب دیگر انتقال دادیم و به RNA انتقال داده شده به میکروتیوب‌های جدید 1ml محلول ایزوپروپانول (Merck, Germany) اضافه کردیم سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور 12000rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌فریوژ کردیم، سپس محیط

روی میکرولیوب ها را خالی نموده و فقط رسوب RNA ها در ته میکرولیوب ها باقی ماند، سپس میکرولیوب ها را به مدت یک ساعت در دمای اتاق با در باز قرار دادیم تا اتانول به صورت کامل خارج و خشک شود، سپس به هر میکرولیوب مقدار 30µl محلول Nuclease Free Water (EXIQON, Denmark) اضافه کردیم و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد قرار دادیم و سپس آن ها را در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمودیم.

سنتز cDNA ی miRNA:

در این مرحله سنتز CDNA بر اساس کیت EXIQON انجام گرفت. ابتدا غلظت RNA استخراج شده به وسیله دستگاه Nano Drop (ThermoScientific, 2000c, USA) اندازه گیری شد. سپس طبق پروتکل جهت سنتز cDNA مقدار ۱۵µg RNA مورد نیاز بود که بر اساس غلظت نمونه های موجود و بستن تناسب مقداری از نمونه ها که باید برای سنتز استفاده شود را مشخص نمودیم و آن ها را در میکرولیوب ها ریخته و سپس با محلول Nuclease Free Water (EXIQON, Denmark) به حجم 500µl رساندیم، سپس به همه میکرولیوب ها 1µl Enzyme mix، 2µl 5x reaction buffer (EXIQON, Denmark) و 2µl (EXIQON, Denmark) و پس از مخلوط آن ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و به سرعت در چهار درجه سانتی گراد در دستگاه RT-PCR (BioRad, T100 Thermal Cycle, USA) قرار دادیم تا پیچیدگی ها، سنجاق سری ها و کلمپ های RNA از هم باز شده و تک رشته ای شوند تا پرایمر به درستی در جای خود قرار گیرد، پس از اتمام مدت زمان سنتز نمونه ها را برچسب گذاری کرده و در ۲۰- درجه سانتی گراد برای مدت زمان کوتاه نگهداری نمودیم. برای مدت زمان های بیشتر باید در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شود.

miRNA Gene qRT-PCR

بعد از سنتز cDNA میزان بیان miRNA-145 به وسیله qRT-PCR اندازه گیری کردیم. به طوری که ابتدا cDNA ها را طبق پروتکل 1 به 80 رقیق سازی نمودیم، سپس از cDNA های رقیق شده 4µl به میکرولیوب های مخصوص qRT-PCR انتقال دادیم، سپس به هر یک از میکرولیوب ها مقدار 5µl Master شامل dNTP و SYBR Green (EXIQON, Denmark) اضافه کرده و همچنین 1µl پرایمر hsa-miRNA-145 Primer mix

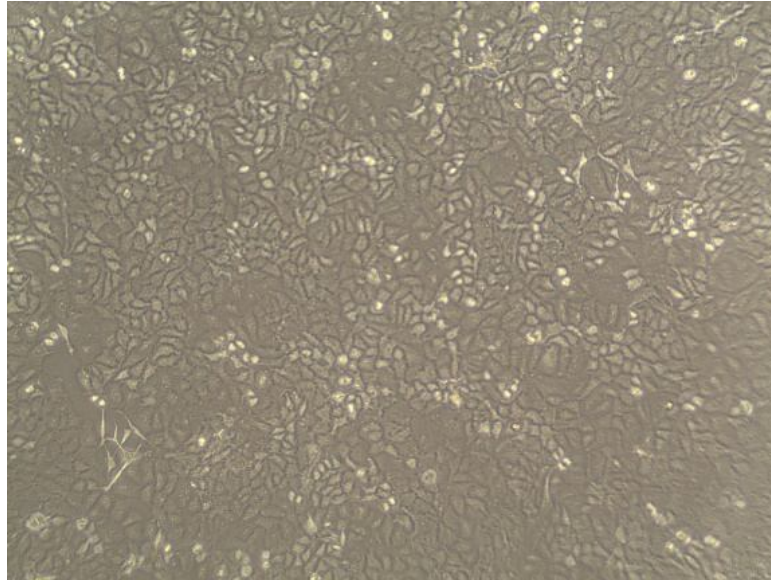
Wound Healing Assay

در این تست سلول ها به مقدار 5×10^5 عدد در پلیت ۶ خانه ای کشت دادیم، پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون و پس از چسبیدن سلول ها به کف پلیت و پر کردن کامل کف آن، سلول ها با نوک سرسمپلر زرد استریل شیری در محیط کشت ایجاد گردید و چاهک ها یکبار با بافر PBS شستشو داده شد، بعد محیط کشت غنی با 10% FBS به این پلیت ها اضافه کردیم، سپس توسط میکروسکوپ معکوس (Optika, XDS-3, Italy) از چاهک ها در ساعت ۰ (شروع تست) عکس برداری شد، بعد از گذشت مدت زمان های ۶ ساعته، ۱۲ ساعته، ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته مهاجرت سلول ها از لبه شکاف به محل شکاف در نمونه های ترانسفکت شده و نمونه کنترل مقایسه و عکس برداری شد.

یافته ها

نتیجه کشت سلولی:

پس از دفریز کردن رده ی سلولی A549 و انتقال به محیط کشت درون فلاسک، و چندین سری پاساژ دادن، سلول ها در فاز لگاریتمی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).

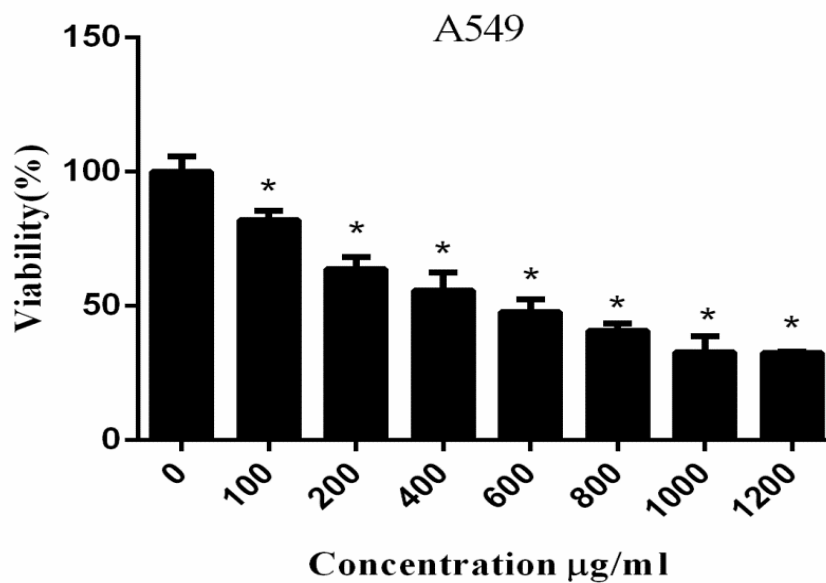


شکل (۱): عکس سلول‌های A549 با بزرگنمایی ۴۰

نتایج MTT جهت تعیین دوز مناسب آنتی‌بیوتیک:

494.1 بود. به طوری بعد از ترانسفکت کردن سلول‌ها بر انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده از این دوز استفاده گردید. نتایج در نمودار ۱ آورده شده است.

برای به دست آوردن IC₅₀ آنتی‌بیوتیک G-418 تست MTT انجام گرفت. سلول‌ها با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ µg/ml تیمار گردید و IC₅₀ به دست آمده برای سلول‌های A549 برابر µg/ml

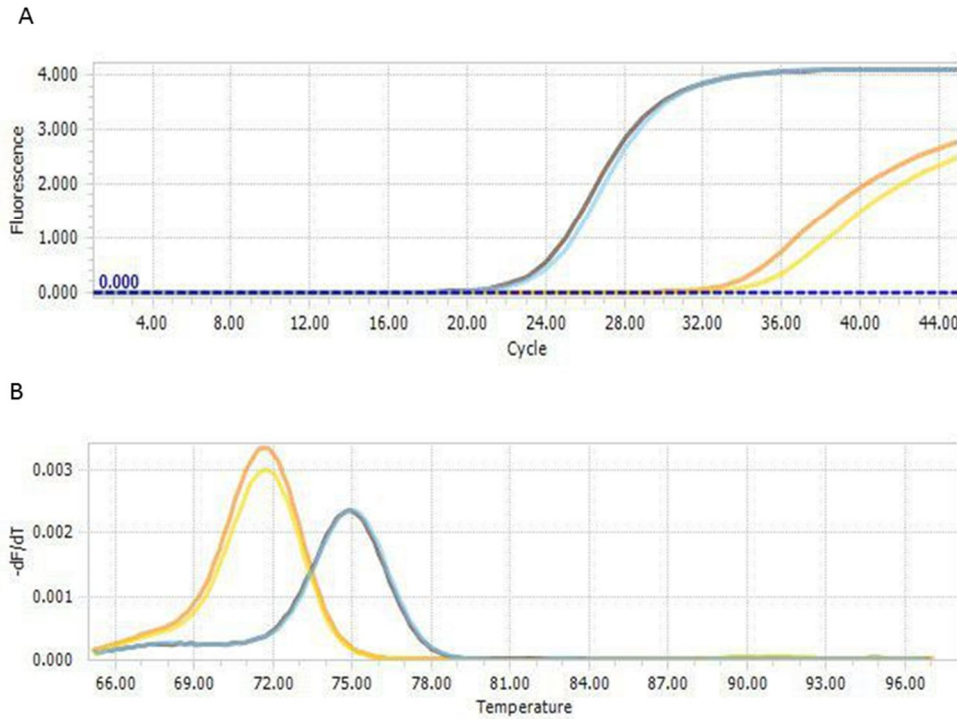


نمودار (۱): زنده ماندن سلول‌ها در دوزهای مختلف آنتی‌بیوتیک Geneticin را نشان می‌دهد. × کاهش زنده‌بودن سلول‌ها را با $P < 0.05$ را نشان می‌دهد.

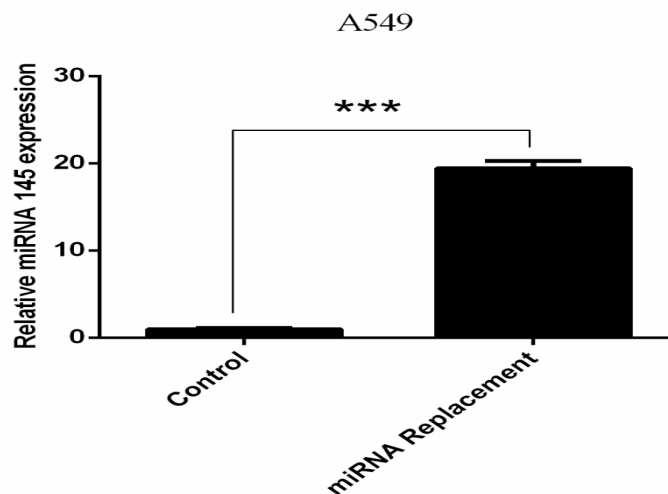
نتایج تأثیر جایگزینی ژن miRNA-145 بر میزان بیان این ژن:

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، تأثیر جایگزینی ژن miRNA-145 در رده سلولی A549 و میزان بیان miRNA-145 در گروه کنترل و گروه سلول‌های ترانسفکت شده توسط آزمایش qRT-PCR ارزیابی گردید. نمودارهای Amplification و

Melting به دست آمده از Real Time PCR مربوط به بیان MMP-9 در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از qRT-PCR در نمودار ۳ نشان داده شده است: همان‌طور که نتایج به دست آمده ثابت نمود که میزان بیان miRNA-145 در سلول‌های A549 پس از جایگزینی افزایش یافت.



نمودار (۲): نمودار Real Time PCR (A) و نمودار Melting miRNA-145 (B) (Amplification miRNA-145)

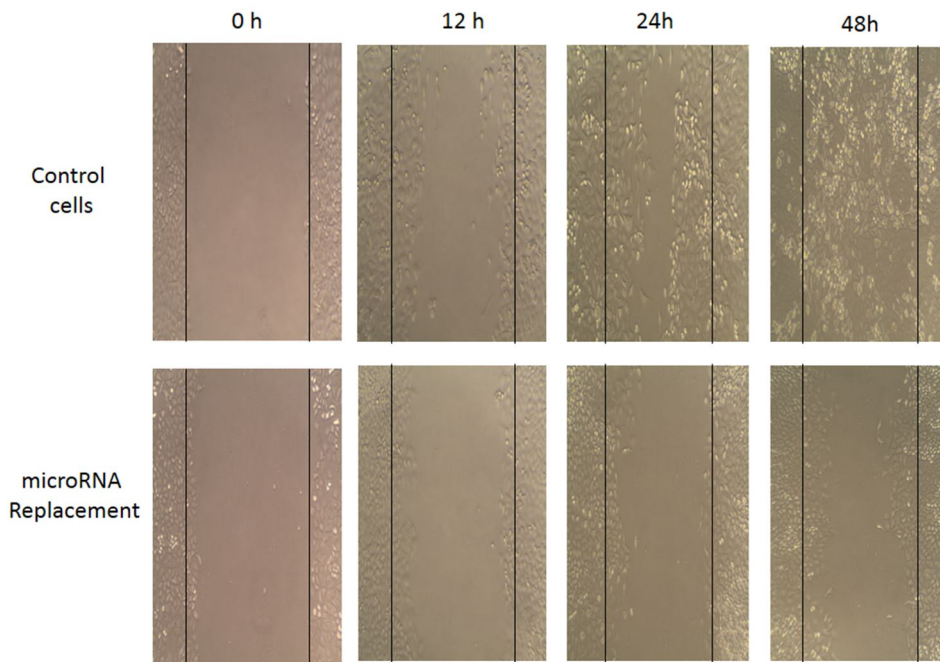


نمودار (۳): تأثیر جایگزینی has-miRNA-145 بر میزان بیان ژن miRNA-145 در سلول‌های A549. $\times\times\times$ افزایش بیان میکرو RNA با $P < 0.01$ را نشان می‌دهد.

مجموعه‌ای از عکس‌ها گردآوری شده و مقایسه آن‌ها باهم به صورت مشخص نشان‌دهنده کاهش مهاجرت سلول‌ها پس از جایگزینی می‌باشد. (شکل ۲).

تأثیر جایگزینی miRNA-145 بر مهاجرت رده سلولی A549:

برای ارزیابی اثر افزایش بیان miRNA-145 در مهاجرت سلول‌های رده سلولی A549 تست Wound healing assay test یا تست خراش انجام گرفت. بررسی نتایج این تست که به صورت



شکل (۲): میزان مهاجرت سلول‌های سرطان ریه را در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می‌دهد که در سلول‌های ترانسفکت شده کم‌تر از سلول‌های کنترل می‌باشد.

بیماران در عرض چند ماه بعد از تشخیص از دنیا می‌روند (۹). بنابراین اهمیت انجام بسیاری از کارهای تحقیقاتی در این زمینه مشخص می‌شود. miRNA های سرکوب‌کننده توموری در سرطان ریه همانند سایر سرطان‌ها شامل miRNA هایی می‌باشند که میزان بیان آن‌ها رابطه معکوس با سرعت و شدت سرطان دارند. دستیابی به روش‌های کارآمد برای بازگرداندن بیان این miRNA های تومور ساپرسور برای درمان و کنترل خود سرطان و یا عوارض ناشی از این بیماری بسیار مورد توجه می‌باشد (۲۷، ۲۸). عوامل مختلفی در بروز و کنترل متاستاز دخالت دارد. استراتژی‌های مؤثر جهت مهار و کنترل پیشرفت متاستاز نیاز به فهم دقیق مکانیسم مولکولی متاستاز، واکنش‌های میزبان-تومور و مولکول‌های تنظیم‌کننده‌ای که فرایند متاستاز را در مراحل مختلف تنظیم می‌کنند، دارد (۲۹).

بحث و نتیجه‌گیری

در سراسر دنیا، سرطان ریه شایع‌ترین دلیل مرگ‌ومیر مربوط به سرطان در بین زنان و مردان به شمار می‌رود (۲۵). که دلیل اصلی مرگ به علت سرطان در مردان، و دومین دلیل مرگ به علت سرطان در زنان است (۲۲). با توجه به آنکه سرطان ریه یک بیماری کشنده است و نرخ زنده ماندن ۵ ساله‌ی آن کم‌تر از ۱۵ درصد می‌باشد، ارزیابی مقدماتی از بیمار برای انتخاب روش‌های درمانی بهتر ضروری است. با وجود بهبود در استراتژی‌های نظارت و درمان بالینی، بقای ۵ ساله بعد از برداشتن تومور تنها ۳۰-۶۰ درصد گزارش شده است (۲۶). متأسفانه، بسیاری از بیماران مبتلا به سرطان ریه در مراحل پیشرفته بیماری تشخیص داده می‌شود و اگرچه داروهای جدید زیرمجموعه‌های کوچک از این بیماران را بهبود بخشیده و بقای کلی و کیفیت معقول زندگی را ارائه می‌دهند، اکثر بیماران تنها می‌توانند با شیمی‌درمانی درمان شوند. بقای کلی نامساعد است و بسیاری از

بیماران مورد مطالعه بود. کاهش متاستاز پس از ترانسفکت miRNA-145 به سل لاین پروستات توسط تست Wound healing assay test گزارش گردید (۳۰).

در سال ۲۰۱۴ Yan و همکارانش اثر miRNA-145 بر روی رسیپتور ERBB3 در سلول‌های سرطانی سینه (in vitro) و در mice (in vivo) بررسی کردند. نتایج بیانگر کاهش پرولیفراسیون و مهاجم در بافت‌های مورد مطالعه بود (۳۱).

در سال ۲۰۱۱ Dipankar Pramanik و همکارانش با استفاده از فن miRNA Replacement therapy نانوکوتور لیپوزومال حاوی ژن‌های miRNA-143، miRNA-145، miRNA-34a را وارد سلول‌های سرطانی پانکراس کردند، افزایش بیان این miRNA ها در سلول‌های سرطانی پانکراس باعث کاهش تکثیر، رشد و متاستاز و افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها گردید (۳۲).

همان‌طور که مطالعات چند نمونه فوق نشان می‌دهد درمان مولکولی هدفمند یک فناوری جدید در حال رشد برای درمان سرطان است. ژن درمانی نیز یک نوع درمان هدفمند است که در آن هدف یک ژن خاص می‌باشد که در سلول‌های توموری دچار افزایش یا کاهش بیان می‌شود.

درمان مؤثر برای جلوگیری از متاستاز بستگی به شناسایی دقیق مولکول‌های تعیین‌کننده این فرآیند کننده و درک شبکه‌های تنظیمی هدایت‌کننده فعالیت‌های این مولکول‌های عملگردی دارد (۲۹).

یکی از مزایای استفاده از miRNA ها به‌عنوان اهداف درمانی در سرطان این است که یک miRNA می‌تواند چندین mRNA را هدف قرار دهد طرفی یک mRNA، هدف چند miRNA قرار می‌گیرد (۳۳).

بر اساس داده‌های پیش‌بالینی با استفاده از miRNA-34a، در ماه آوریل سال ۲۰۱۳، miRNA-34a اولین miRNA یی بود که به فاز I آزمایش‌های بالینی در بیماران مبتلا به سرطان کبد با حمایت مالی (Mirna Therapeutics (Austin, TX, USA) رسیده بود. Mirna Therapeutics MRX34 یک میمیک (مقلد) از miRNA-34a است که در یک کیسه لیپوزوم محصور شده که توسط Marina Biotech (Bothell, WA, USA) ایجاد شده است که با استفاده از وکتور Nov340 Liposome حاوی miRNA-34a روی سلول‌های سرطانی کبد و موش‌هایی که سرطان کبد در آن‌ها القا شده بود به‌صورت Invivo و Invitro انجام دادند، نتایج نشان‌دهنده حذف تومور در موش‌ها و کاهش تکثیر، متاستاز و افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی بود (۳۴).

نتایج بررسی ما مشخص نمود که با توجه به تست Wound Healing Assay افزایش بیان miRNA-145 باعث کاهش

کشف miRNA به‌عنوان تنظیم‌کنندگان اصلی ژن امیدهای تازه و مؤثر را در بحث مهار متاستاز در سرطان به وجود آورده است. یکی از miRNA های مورد توجه که گزارش‌های متعددی از کاهش بیان آن در سرطان‌های مختلف، از جمله سرطان سینه، ریه، کولون و تخمدان دسترس می‌باشد، miRNA-145 می‌باشد (۲۲).

از آنجاکه کاهش بیان miRNA-145 در سرطان ریه باعث افزایش تکثیر و متاستاز و کاهش آپوپتوز می‌شود، می‌توان این miRNA را به‌عنوان یک هدف درمانی برای سرطان ریه مطرح نمود و در اینجا روش جدیدی به نام miRNA Replacement therapy مطرح می‌شود که در این روش با جایگزینی miRNA در سلول‌های سرطانی از طریق ترانسفکت ژن miRNA مورد نظر توسط وکتور، می‌توان بیان miRNA را در سلول‌های سرطانی به سطح طبیعی بازگرداند و miRNA مورد نظر بیان ژن‌های هدف خود را به‌صورت طبیعی تنظیم نماید. از مزایای این روش می‌توان به طبیعی بودن تومورساپرسورها و پایداری آن‌ها در بافت‌های نرمال بدن، کنترل چندین مسیر ایجاد سرطان و تعداد زیادی انکوژن اشاره کرد و همچنین به علت وجود تعداد فراوان این مولکول‌ها در سلول‌های نرمال عوارض جانبی کاهش می‌یابد و از طرفی باعث افزایش حساسیت سلول‌های توموری می‌گردد (۲۴، ۲۵).

در این مطالعه نتیجه اولیه جایگزینی miRNA-145 که با دستگاه RealTime PCR نشان داده شد، حاکی از موفقیت‌آمیز بودن روش انتقال کانستراکت miRNA-145 با استفاده از پروتکل jetPEI بود.

به دلیل اینکه وکتور مورد استفاده دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Geneticin می‌باشد و ما در کشت سلولی با توجه به IC50 به‌دست‌آمده از دوز مناسب این آنتی‌بیوتیک استفاده کردیم، پس می‌توان ادعا کرد که فقط سلول‌های دریافت‌کننده پلاسמיד قادر به ادامه حیات در محیط کشت حاوی G-418 Geneticin بوده و بقیه سلول‌ها اکثراً حذف شدند.

همچنین نتایج به‌دست‌آمده از qRT-PCR و افزایش معنی‌دار بیان ژن miRNA-145 پس از جایگزینی توسط کانستراکت در سلول‌های سرطانی A549 در مقایسه با گروه کنترل، بیانگر صحیح بودن ترانسفکت و داشتن عملکرد قابل‌قبول جهت افزایش بیان ژن انکوساپرسور miRNA-145 می‌باشد. قابلیت بیان ژن پس از انتقال به درون ژنوم از این نظر دارای اهمیت است که نشان‌دهنده وارد شد صحیح ژن در DNA سلول و عملکردی بودن آن می‌باشد.

نتایج ما همسو با نتایج مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۱۱ توسط Xinsheng Peng بر روی نمونه‌های سرطان پروستات در کشور چین انجام گرفته است. نتایج اولیه مطالعه ایشان بیانگر ارتباط میان کاهش miRNA-145 و افزایش متاستاز به استخوان در نمونه‌های

به‌طور خلاصه یافته‌های ما نشان می‌دهد که miRNA-145 می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی در درمان سرطان ریه باشد و به‌عنوان یک عامل در جلوگیری از متاستاز سرطان ریه می‌باشد.

مهاجرت و متاستاز سلول‌های *vec+* (وکتور حامل ژن miRNA-145) نسبت به سلول‌های کنترل رده‌ی سلولی A549 در سرطان ریه شده و قابلیت تومور زایی کاهش یافت.

References:

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(5):277-300.
- American Cancer Society. Atlanta G. Cancer Facts & Figures 2014 American Cancer Society; 2014.
- Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S. J. Jameson J, Loscalzo J. Harrison Principles of Internal Medicine. Mc Graw Hill; 2012.
- Tufman A, Tian F, Huber RM. Can microRNAs improve the management of lung cancer patients? A clinician's perspective. *Theranostics* 2013;3(12):953-63.
- Ferlay J. GLOBOCAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10. <http://globocan.iarc.fr> [Internet] 2010 [cited 2017 Aug 10]; Available from: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10027817827/>.
- Bader AG, Lammers P. The therapeutic potential of microRNAs. *Innovations in Pharmaceutical Technology* 2011:52-5.
- Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, Baradaran B. Micro-RNAs: The new potential biomarkers in cancer diagnosis, prognosis and cancer therapy. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 2014;61(5):1-10.
- Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran B. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2016;84:705-13.
- Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(3-4):369-78.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
- Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(7):2257-61.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7065-70.
- Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120(5):1046-54.
- Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10(10):704-14.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Genet* 2006;6(4):259-69.
- Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, et al. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. *Mol Ther* 2011;19(6):1123-30.
- Qiu T, Zhou X, Wang J, Du Y, Xu J, Huang Z, et al. MiR-145, miR-133a and miR-133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer. *FEBS letters* 2014;588(7):1168-77.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* 2006;6(11):857-66.
- He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Genet* 2007;7(11):819-22.

20. Check HE. Cancer complexity slows quest for cure. *Nature* 2008;455(7210):148.-
21. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Genet* 2009;9(4):293-302.
22. Cui S-Y, Wang R, Chen L-B. MicroRNA-145: a potent tumour suppressor that regulates multiple cellular pathways. *J Cell Mol Med* 2014;18(10):1913–26..
23. Le Beau MM, Lemons RS, Larson R, Arai N, Rowley J. Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del (5q). *Blood* 1989;73(3):647-50.
24. Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer* 2010;9(1):1.
25. Wang C-J, Zhou Z-G, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and-145 expression in colorectal cancer. *Disease Markers* 2009;26(1):27-34.
26. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 2010;11(7):537–61.
27. MacFarlane L-A, R Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics* 2010;11(7):537-61.
28. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004;64(11):3753-6.
29. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Med* 2006;12(8):895-904.
30. Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu Xa, Xiong D, et al. Identification of miRs-143 and-145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PloS one* 2011;6(5):e20341.
31. Yan X, Chen X, Liang H, Deng T, Chen W, Zhang S, et al. miR-143 and miR-145 synergistically regulate ERBB3 to suppress cell proliferation and invasion in breast cancer. *Mol Cancer* 2014;13(1):1.
32. Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther* 2011;10(8):1470-80.
33. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;80(2):193-208.
34. Bouchie A. First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol* 2013;31(7):577.

MICRORNA-145 INHIBITS MIGRATION OF HUMAN NON-SMALL-CELL LUNG CANCER (A549)

Navaz Sadeghie^{1,2}, Behzad Baradaran^{3*}

Received: 22 Apr, 2017; Accepted: 22 June, 2017

Abstract

Background & Aims: Lung cancer is the most common cancer in men and the main cause of male cancer deaths worldwide. Also, it is the second leading cause of cancer deaths in women worldwide. In this study, we replaced miRNA145 in lung cancer cells by vector based miRNA-145, then the level of miRNA expression in these cells increased and we investigated the effects of the miRNA on inhibition of metastasis.

Materials & Methods: After A549 cell line culturing, we obtained IC50 of Gentamicin antibiotic (G418) by using MTT test. In the following miRNA-145 was transferred into lung cancer cells, by using JetPAI. QRT-PCR test was used to confirm the transfer of miRNA-145 into cells. We use wound healing test to check the immigration status of transfected cells and control cells.

Results: By using MTT test, the IC50 of Gentamicin antibiotic was obtained 494.1 µg/ml. The results of the qRT-PCR test showed the increased expression level of miRNA-145 in A549 transfected cells. The wound healing test results showed migration reduction of transfected cells compared to control cells.

Conclusion: The results that we obtained shows that increasing miRNA-145 expression level has a role in the reduction of metastasis at lung cancer cell line A549.

Keywords: MiRNA, Lung cancer, Metastasis, Transfected

Address: Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Daneshgah Ave, Tabriz, Iran

Tel: (+98)4133371440

Email: Behzad_im@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 28(5): 331 ISSN: 1027-3727

¹ Department of Genetics, East Azarbaijan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

² Department of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

³ Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)