Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 18, No. 4, Winter 2019, Pages 452-462

Investigation of the Effect of miR-146a-5p on Expression of MMP9 Gene in Colorectal Cancer Cell Line (HT-29)

Noorolyai S, Baradaran B*

Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
**** Corresponding author.*** Tel: +98413337144, Fax: +984133371311, E-mail: baradaranb@tbzmed.ac.ir

Received: Oct 22, 2018 Accepted: Dec 21, 2018

ABSTRACT

Backgrounds & objectives: Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer death worldwide. Micro RNAs are a group of non-coding small RNAs that inhibit the translation of target mRNA. MiR-146a-5p, as a tumor suppressor, has abnormal expression in many cancers. In this basic research, our goal was to restore the expression level of miR-146a-5p to normal level and to investigate its effect on the expression of the MMP9 gene in HT-29 cells.

Methods: this study evaluates the effect of transfection of miR-146a-5p in HT-29 cell line. At first, the HT-29 cell line from colorectal cancer was cultured in RPMI-1640 culture media and then were transfected with miR-146a-5p using Jet-PEI reagent. qRT-PCR technique was employed to evaluate the expression level of miR-146a-5p and MMP9 genes. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software.

Results: According to the obtained data, the onset of the invasion and metastasis, in particular, at the final stage of colorectal cancer may be related to a reduction in the expression of miR-146a-5p. The results of the qrRT-PCR test showed that by increasing the expression level of miR-146a-5p in HT-29 cells, the expression level of MMP9 gene decreased in the miR-146a-5p transfected group compared to the control group.

Conclusions: According to this study, activation of metastatic pathways was due to the down regulation of miR146a-5p. Accordingly, miR-146a-5p can inhibits migration of these cells through down-regulating the expression of metastasis-related genes. Hence, miR-146a-5p can be a new diagnostic biomarker and new therapeutic target for CRC.

Keywords: Colorectal Cancer; HT-29; miR-146a-5p; MMP9

بررسی تاثیر miR-146a-5p در میزان بیان ژن MMP9 در رده سلول سرطان کولورکتال

*سعید نورعلیایی، بهزاد برادران**

مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۷۱۴۴۰ فاکس: ۰۴۱۳۳۳۷۱۳۱۱ پست الکترونیک: baradaranb@tbzmed.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال سومین دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. miRNA ها، گروهی از RNA های کوچک غیر کدکننده می‌باشند که باعث مهار ترجمه mRNA هدف می‌شوند. miR-146a-5p به عنوان تومور ساپرسور می‌باشد که بیان نابجای آن در بسیاری از سرطان ها نشان داده شده است. در این مطالعه که یک مطالعه بنیادی و پایه بود، هدف بازگردانی سطح بیان miR-146a-5p به حد طبیعی و بررسی تاثیر آن بر بیان ژن MMP9 در سلول‌های HT-29 بود.

روش کار: ابتدا رده سلولی HT-29 از سرطان کولورکتال در محیط کشت RPMI-1640 کشت داده شد. سپس miR-146a-5p توسط معرف Jet-PEI ترانسفکت گردیده و با استفاده از تکنیک qRT-PCR بیان miR-146a-5p و ژن MMP9 در سلول های HT-29 ترانسفکت شده با miR-146a-5p و کنترل ارزیابی گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 6 انجام گرفت.

یافته ها: بر اساس داده های به دست آمده، آغاز مسیرهای تهاجم و متاستاز می‌تواند ناشی از کاهش بیان miR-146a-5p به طور خاص، در مرحله آخر بیماری سرطان کولورکتال باشد. نتایج تست qRT-PCR که برای بررسی بیان ژن‌ها انجام شد، نشان داد که miR-146a-5p باعث کاهش بیان ژن MMP9 در گروه ترانسفکت شده با miR-146a-5p در مقایسه با گروه کنترل می‌شود.

نتیجه گیری: بر اساس این مطالعه فعال شدن مسیرهای متاستاز، ناشی از کاهش بیان miR-146a-5p می‌باشد. بر این اساس miR-146a-5p می‌تواند باعث مهار مهاجرت سلولی در شرایط آزمایشگاهی از طریق کاهش بیان ژن های درگیر در متاستاز از جمله MMP9 شود. بنابراین miR-146a-5p می‌تواند بعنوان یک بیومارکر تشخیصی و هدف درمانی جدید برای درمان سرطان کولورکتال معرفی گردد.

واژه های کلیدی: سرطان کولورکتال، HT-29، miR-146a-5p، MMP9

دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۳۰ **پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۹/۳۰

مقدمه

امروزه سرطان یکی از عمده‌ترین دلایل مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می‌شود، که در انواع و اشکال متفاوت با مسیرها و واکنش‌های متنوع موجب اختلال در فعالیت طبیعی سلول‌های بافت و در نهایت ارگان مورد نظر می‌شوند. در اکثر بافت‌های اپیتلیال، سرطان از طریق مراحل جداگانه و در هم آمیخته از گسترش کلونال، تنوع ژنتیکی و انتخاب کلون به وجود

می‌آید. در طول رشد سرطان، سلول‌های سرطانی توانایی‌های بیولوژیکی متنوعی را که در اثر تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی آنها ایجاد می‌شود، به دست می‌آورند [۱]. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۱۶ ، سالانه ۱۲۰۰۰۰۰ نفر به سرطان کولورکتال مبتلا می‌شوند که از این بین حدود ۶۰۰۰۰۰ منجر به مرگ می‌شود. سرطان کولورکتال به عنوان سومین عامل مرگ و میر بعلت سرطان محسوب می‌شود [۲]. شیوع سرطان کولون در ایران ۸-۷ نفر در بین ۱۰۰۰۰۰ نفر از جمعیت زنان و مردان بوده که این آمار بسیار نزدیک به آمار گزارش شده در سایر کشورهای خاورمیانه بوده ولی نسبت به کشورهای غربی پایین‌تر است [۳].

به نظر می‌رسد ژن‌های کد کننده پروتئین‌ها، که نزدیک به ۲ درصد از ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند، تنها مولکول‌هایی نیستند که برنامه‌ریزی و تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیکی را در موجودات زنده بر عهده دارند. اکثر ترانسکریپتوم‌ها[1] در نتیجه رونویسی RNAهایی هستند که پتانسیل کدکردن پروتئین را ندارند این RNAها را ncRNA [2] می‌نامند. علاوه بر این، تعداد ncRNAs به نسبت پیچیدگی ارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد و این نشان دهنده اهمیت و نقش بسیار مهم آنها در تعدیل واکنش‌های درون سلولی است [٤،٥].

امروزه نقش گروه جدیدی از کلاس‌های مختلف RNAهای غیرکدشونده به نام miRNAها، در سرطان‌زایی آشکار شده است [۶،۷]. microRNAها دسته ای از RNAهای غیرکدشونده و تنظیمی به طول تقریبی ۲۲-۱۸ نوکلئوتید هستند که در تنظیم بیان ژن هدف، پس از رونویسی، از طریق اتصال به نواحی 3′UTR از mRNA کدکننده پروتئین نقش اساسی دارند. یک microRNA به تنهایی ممکن است mRNAهای هدف متعددی را تنظیم نماید [۷،۸].

در دهه اخیر نقش ncRNAها در سرطان با اکثر مطالعاتی که بر روی microRNAها (miRNAs)، یک نوع کوچک از ncRNAهای محافظت شده، انجام شده به شدت مورد توجه و بررسی دانشمندان قرار گرفته است. عملکرد miRNAs در بسیاری از انواع سرطان مختل شده و نقش آنها به عنوان انکوژن‌ها یا سرکوب کننده‌های تومور با مطالعات متعدد مورد تایید قرار گرفته است [۸]. بسیاری از miRNAها در طیف گسترده ای از فرآیندهای بیولوژیکی شامل رشد، تکثیر سلولی، متابولیسم و سیگنالینگ دخالت می‌کنند [۹]. اخیراً مقدار قابل توجهی از miRNAها در انواع مایعات بیولوژیکی بدن نظیر پلاسمای خون و سرم خون یافت شده است. تغییرات بیان miRNAها در سرطان از طریق تغییرات اپی ژنتیکی، از جمله متیلاسیون DNA، اصلاح هیستون و همچنین تغییرات ژنتیکی می‌توانند رخ دهد، که این دو مکانیسم بیولوژیکی می‌توانند تولید RNA اولیه و همچنین پردازش آنها را به شکل miRNA بالغ و نیز تعامل آن با اهداف mRNA را تحت تاثیر قرار دهد [۵،۱۰]. به علاوه وجود نوع خاصی از miRNAها در گردش خون که به شدت با ظهور، تهاجم و متاستاز سرطان ارتباط دارد، نشان می‌دهد که miRNAهای موجود در مایعات بدن ممکن است بعنوان یک کلاس از نشانگرهای زیستی جدید برای تشخیص سرطان و پیش آگهی آن مورد استفاده قرار گیرند [۱۱،۱۲].

اولین بار miRNAها در Caenorhabditis elegans که به صورت یک RNA به طول ۲۲ نوکلئوتید که ضرورتاً برای توسعه سلول‌ها در دوره post-embryonic بیان می‌شد، کشف گردید [۱۳].

تحقیقات حاکی از این است که در ژنوم انسان حدود ۱۰۰۰, microRNA وجود دارد در حالی که تنها تعداد معدودی از آنها به طور عملی توصیف و شناسایی شده اند. هر یک از microRNAها توانایی تاثیر بر

---

[1] mRNA هایی که رونویسی شده اند ولی منجر به تولید پروتئین نمی شوند.

[2] None Coding RNA

چندین ژن مختلف به عنوان ژن هدف را دارا می‌باشند که نهایتاً تعدادی از این چند هزار mRNA را تحت تاثیر قرار می‌دهد به طوری که در حدود ۴۰ درصد ژن‌های کدکننده پروتئین در انسان تحت تاثیر microRNAها تنظیم می‌شوند [۱۴].

با توجه به شیوع بالا و میزان مرگ و میر بالای سرطان و همچنین با توجه به عوارض شدید درمان‌های رایج و عود مجدد بیماری پس از مراحل درمان، امروزه یکی از شیوه‌های نوین درمانی، استفاده از microRNAها می‌باشد.

عملکردهای بیولوژیکی microRNAها به شدت وابسته به سلولی است که در آن قرار دارند که با توجه به رونوشت‌های متنوع ژن‌ها در بافت‌ها و سلول‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. بنابراین بسته به رونوشت ژن هدف آن، بیان بعضی از microRNAها در یک سرطان افزایش یافته و به عنوان انکوژن عمل می‌کنند، در حالی که همان microRNAها در انواع دیگر از تومورها کاهش بیان داشته و به عنوان سرکوب کننده عمل می‌کنند [۱۵،۱۶]. بر این اساس microRNAها مسئول تعدیل مسیرهای پیام رسانی متعددی هستند که در رشد سلول، تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش ایفا می‌کنند [۱۶].

در حال حاضر microRNAها به عنوان اهداف درمانی و ابزاری برای درمان سرطان به کار گرفته می‌شوند. بازگرداندن microRNAها به سطح طبیعی، پتانسیل قابل توجهی را برای مداخلات درمانی در اختیار قرار می‌دهد [۱۵]. به طور کلی روش‌های درمانی مبنی بر microRNAها را می‌توان به دو دسته مختلف تقسیم کرد:

۱. بازگرداندن فعالیت microRNAهای سرکوب‌کننده تومور با استفاده از وکتورهای ژنی بیان‌کننده microRNA مورد نظر یا microRNA میمیک دو رشته ای که اصطلاحاً microRNA Replacement Therapy نامیده می‌شود.

۲. مهار microRNA انکوژنیک با استفاده از الیگونوکلوتیدهای تک رشته ای که تغییرات شیمیایی روی آنها انجام شده و نقش مهاری دارند [۱۷].

microRNAها نقش مهمی را در بیولوژی سرطان کولورکتال ایفا می‌کنند. ازجمله تومورزایی، پیشرفت تومور، تهاجم، متاستاز و رگ زایی [۱۸].

از جمله microRNAهای سرکوب کننده تومور در کلون می‌توان به miR-146a-5p اشاره کرد. به طور کلی مطالعات نشان می‌دهند که بیان این microRNA در سرطان‌های انسانی کاهش می‌یابد و این کاهش بیان با توسعه و پیشرفت بیماری در ارتباط است [۱۹،۲۰].

اکثر مطالعات نشان دهنده این است که کاهش بیان miR-146a-5p در رده‌های سلولی سرطانی با پیشرفت تومور، متاستاز غدد لنفاوی، تهاجم عروقی و بقای ضعیف بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در ارتباط است [۲۱،۲۲].

در این پژوهش، که یک مطالعه بنیادی و پایه بود، با استفاده از تکنیک miRNA replacement therapy، ، میمیکِ (mimic) miR-146a-5p به‌عنوان یک هدف درمانی، وارد سلول‌های سرطان کولورکتال گردید. انتظار می‌رفت با جایگزینی این microRNA سطح بیان این miRNA در سلول‌هایی که کاهش بیان داشتند، افزایش یابد.

هدف این پروژه بررسی اثر جایگزینی miR-146a-5p بر بیان ژن متالوپروتئیناز -۹ [1]، که در مهاجرت سلول‌های سرطانی نقش دارد، بود.

روش کار

کشت سلولی

رده سلولی HT-29 مربوط به سرطان کولورکتال با منشاءِ انسانی از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این رده سلولی در محیط کشت RPMI 1640 حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین ۱۰۰IU/ml، استرپتومایسین

[1] MMP9

µg/ml ۱۰۰، غنی‌شده با ۱۰ درصد FBS، ال-گلوتامین و در دمای ^{o}C ۳۷، فشار ۵ درصد از CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت در انکوباتور کشت داده شد.

ترانسفکت miRNA

برای انجام ترانسفکشن، ابتدا سلول‌ها به تعداد ۲×۱۰^{۵} در هر یک از چاهک‌های پلیت شش خانه ای، پخش شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت سلول‌ها را در انکوباتور نگهداری نموده و زمانی که سلول‌ها ۵۰ تا۷۰ درصد چاهک‌ها را پر نمودند و از نظر ظاهری مورفولوژی خود را به دست آوردند، عمل ترانسفکشن بر روی سلول‌ها انجام شد.

طبق پروتوکول jetPEI® in vitro miRNA Transfection ترانسفکشن mimic miR-146 بر روی سلول‌ها انجام گرفت. به این ترتیب که ابتدا در میکروتیوب‌های جدا محلول‌های JetPRIM buffer و miRNA در غلظت ۱۰۰ پیکومول مخلوط شدند، سپس JetPRIM reagent اضافه شد و بعد از همگن نمودن محلول‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون انجام گرفت، سپس بر روی سلول‌ها اضافه گشت. به منظور ارزیابی میزان ترانسفکشن، miRNA کنترل کونژوگه شده با فلوروکروم FITC نیز بر روی سلول‌ها ترانسفکت شد. با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری MACSQuant Analyzer 10 ، ساخت شرکت Miltenyi Biotech کشور آلمان، میزان ترانسفکت سلول‌ها بدست آمد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از ترانسفکشن سلول‌های HT-29 با miR146a، با استفاده از کیت ترایزول (Gene All, Korea) استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای جداسازی RNA از کلروفرم و ایزوپروپانول و برای شستشو از اتانول ۷۵ درصد استفاده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت RNAهای استخراج شده و کیفیت آن‌ها اندازه گیری شد. پس از تعیین غلظت‌های RNA و انجام محاسبات مورد نظر، جهت سنتز cDNA ژن miR-146a-5pa از کیت سنتز cDNA، miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit II ساخت شرکت Exiqon دانمارک استفاده شد. برای تهیه cDNA ژنMMP9 از کیت Bio fact ساخت کشور کره استفاده شد.

qRT-PCR

برای بررسی بیان ژن miR146a-5p و MMP9 از تکنیک qRT-PCR استفاده شد. تغییر سطح بیان ژن miR-146a-5pa توسط دستگاه qRT-PCR[1] مدل light cycler (شرکت Roche، کشور آلمان)، با استفاده از رنگ SYBR Green I (شرکت ampilicone، کشور دانمارک) ارزیابی شد پرایمرهای کنترل داخلی (به منظور نرمالایز کردن microRNA) U6 snRNA و miR-146a-5p از شرکت ORIGENE خریداری گردید. تغییر سطح بیان mRNA ژن MMP9 و ژن GAPDH (به منظور نرمال سازی و همسان کردن ژن هدف) توسط دستگاه qRT-PCR مدل light cycler و با استفاده از رنگ SYBR Green I اندازه‌گیری گردید. پرایمر مربوط به ژن MMP9 به وسیله نرم افزار 5Prime و با استفاده از سایت مخصوص طراحی پرایمر، primer blast در NCBI، طراحی گردید.

توالی پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده اند.

[1] Quantitative Real Time PCR

جدول ۱. توالی پرایمر ژن‌های مورد بررسی

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصولات
Has- miR-146a-5p	5′-UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU-3′ Target sequence	70 bp
U6	Forward: 5′-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3′ Reverse: 5′-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3′	93 bp
MMP9	Forward: 5’-ATTTCTGCCAGGACCGCTTCTAC-3’ Reverse: 5’-ATCCGGCAAACTGGCTCCTTC-3’	bp
GAPDH	Forward: 5´- CCTCGTCCCGTAGACAAAA- 3´ Reverse: 5´- AATCTCCACTTTGCCACTG- 3´	166 bp

بررسی بیان ژن miR-146a-5p و MMP9 در فرآیند qRT-PCR به صورت سه گانه[1] انجام گردید و بیان نسبی ژن نسبت به گروه کنترل به وسیله $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه گیری و نرمال سازی شد.

آنالیز آماری

معناداربودن نتایج تست qRT-PCR با مقایسه گروه‌ها به کمک آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه[2] و با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 6، با ۳ بار تکرار انجام گرفت.

یافته‌ها

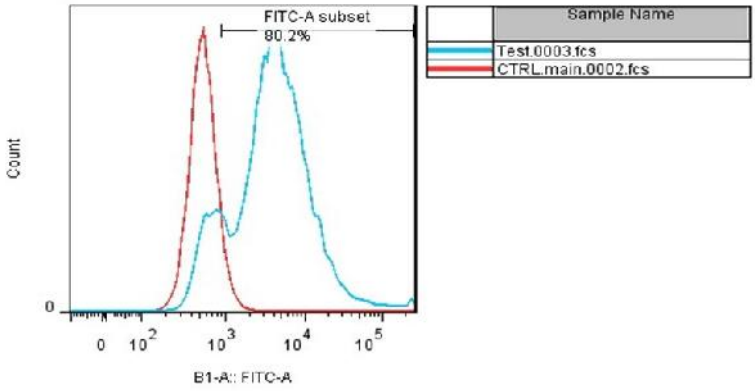
ارزیابی ترانسفکت سلول‌های HT-29 با Control micro RNA

پس از کشت سلول‌های HT-29 و ترانسفکت این سلول‌ها با Control micro RNA متصل به FITC میزان ترانسفکشن گزارش شد. میزان اولیه ترانسفکت سلول‌ها با Control micro RNA متصل به FITC توسط دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردید و درصد ترانسفکت به میزان ۸۰/۲ درصد حاصل شد (نمودار ۱).

تغییرات بیان miR-146a-5p در سلول‌های HT-29 ترانسفکت شده

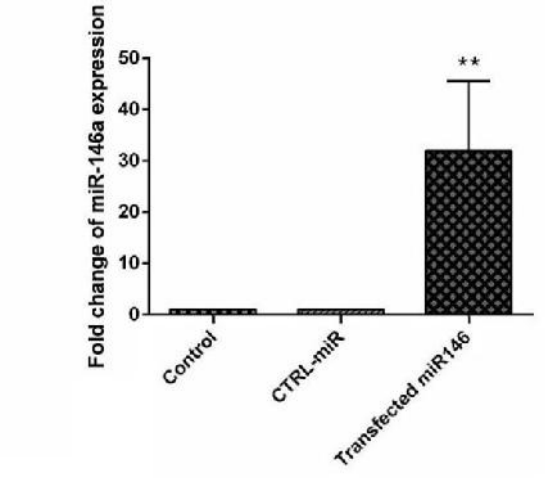
مطابق نمودار ۲ و آنالیز نتایج حاصل از تست q-RT-PCR، افزایش معناداری ($p<۰/۰۵$) در میزان بیان miR-146a-5p در سلول‌های HT-29 ترانسفکت‌شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

[1] Triplicate
[2] One-Way ANOVA



نمودار ۱ : میزان efficiency ترانسفکت در سلول‌های ترانسفکت شده با Control micro RNA.

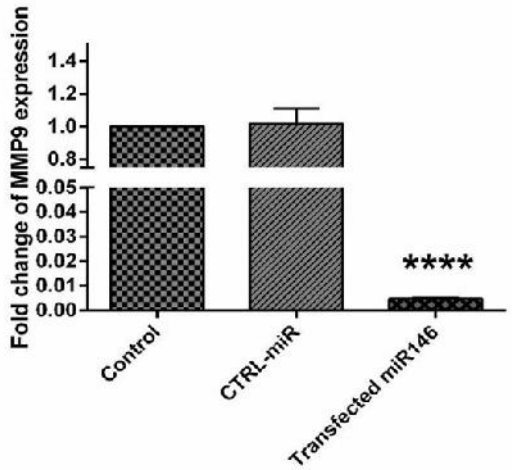
نتایج حاصل از تست فلوسایتومتری نشان می‌دهد که میزان ترانسفکشن سلول‌ها با Control micro RNA (CTRL-miR) به میزان ۸۰/۲ درصد می‌باشد.



نمودار۲. تغییرات بیان miR-146a-5p در سلول های ترانسفکت شده HT-29 . میزان بیان miR-146a-5p در سلول‌های ترانسفکت شده با miR-146a-5p mimic در مقایسه با سلولهای کنترل به صورت معنی داری افزایش پیدا کرده است. (P <0. 05) **

تغییرات بیان ژن MMP9 در سلول‌های ترانسفکت‌شده با miR-146a-5p

آنالیز Ctهای حاصل از منحنی‌های تکثیر نشان داد که میزان بیان ژن MMP9 در سلول‌های HT-29 ترانسفکت شده نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($p<۰/۰۰۰۱$) پیدا کرده است.



نمودار۳. تغییرات بیان ژن MMP9 در سلول‌های ترانسفکت شده با miR-146a-5p.

میزان بیان ژن MMP9 در سلول‌های ترانسفکت شده با miR-146a-5p در مقایسه با سلولهای کنترل و ترانسفکت نشده به صورت معنی داری کاهش پیدا کرده است. (P <0. 0001) ****

بحث

اختلال در بیان miRNAها در انواع سرطان‌ها گزارش شده است، درمان با miRNA در بدخیمی‌های انسانی با هدف قرار دادن مسیرهای مختلف بیماری مانند تومورزایی، رگ زایی و متاستاز صورت می‌گیرد [۲۳]. miRNAهای تومورساپرسور که بر روی ژن‌های انکوژن تاثیر می‌گذارند، در انواع سرطان‌ها با کاهش بیان همراه هستند [۲۴]. بدلیل اینکه miRNAها می‌توانند به تنهایی چندین ژن و مسیر را هدف قرار دهند، اخیراً بازگردانی بیان این مولکول‌ها در مقایسه

با ژن‌تراپی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود هیچ گونه اطلاعات فراگیری در مورد اهداف miRNAها وجود ندارد و انتخاب این مولکول‌ها برای دستکاری باید با احتیاط صورت گیرد. miR-146a-5p یکی از microRNAهایی است که در سرطانهای مختلف از جمله سرطان کولورکتال دچار کاهش بیان می‌شود. سرطان کولورکتال جزو سرطان‌های با شیوع بالا می‌باشد، miR-146a-5p در رده‌های مختلف سلولی این سرطان از جمله HT-29 کاهش بیان شدیدی نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد بازگردانی بیان miRNAهای تومور ساپرسور یک رویکرد امیدوارکننده در درمان سرطان باشد. در میان روش‌های متعدد که تا به حال صورت گرفته است، روش جدیدی به نام microRNA Replacement therapy در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در این روش با جایگزینی miRNAهای تومور ساپرسور در سلول‌های سرطانی، می‌توان بیان miRNA را در سلول‌های سرطانی به سطح طبیعی بازگرداند و از این طریق انکوژن‌های هدف این microRNAها را مهار کرد [۲۵،۲۶].

از مزایای روش microRNA Replacement therapy 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. این روش درمانی مانند سایر روش‌های درمانی هنوز با چالش‌هایی مانند محدودیت‌های مهندسی و طراحی وکتورها و حامل‌ها، جذب ضعیف سلولی، و قرارگیری درست عوامل در جایگاه هدف، هزینه بالای سنتز و تولید مواجه می‌باشد [۶]. بازگردانی بیان miRNAها اولین بار در سال ۲۰۰۷ توسط یانگ سون لی[1] و همکاران معرفی شد، آن‌ها نشان دادند که بازگردانی بیان mimic Let-7 در سرطان ریه می‌تواند منجر به محدود شدن رشد تومور در شرایط invitro و invivo گردد [۲۷]. در سال ۲۰۰۹ جانایا[2] و همکاران جهت بررسی اثر مهاری miR-26a برروی تکثیر سلول‌های سرطانی کبد برای اولین بار از ژن miR-26a استفاده کردند. آن‌ها ابتدا وکتور scAAV حاوی ژن miR-26a و پروتئین فلورسنت سبز eGFP را به صورت invivo با روش تزریق داخل وریدی در موش‌هایی که سرطان کبد در آن‌ها القا شده بود و نیز به صورت invitro به محیط کشت حاوی سلول‌های سرطانی کبد وارد کردند و بعد از سه هفته بیان eGFP و miR-26a را بررسی نمودند، سطح بیان هر دو در طی این مدت افزایش یافته بود. اکثر موش‌ها زنده ماندند و نتایج نشان داد که تکثیر سلول‌های توموری کاهش می‌یابد [۲۴]. اولین دارویی که با استفاده از تکنیک microRNA Replacement therapy تهیه گردید، داروی MRX34 می‌باشد. این دارو در سال ۲۰۱۲ توسط شرکت داروسازی میرنا[3] عرضه شد. در این دارو از وکتور Nov340 Liposome حاوی miR-34a استفاده شده است. داروی MRX34 در فاز اول درمانی Clinical trial برای سرطان کبد می‌باشد [۲۸].

در این مطالعه miR-146a-5p به عنوان کاندید برای بازگردانی بیان miRNA در سلول‌های سرطانی کولورکتال، رده HT-29 انتخاب شد، miR-146a-5p با استفاده از معرف Jet PEI به سلول‌های سرطانی HT-29 ترانسفکت شد و ترانسفکت اولیه با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری MACSQuant Analyzer 10 بررسی و تایید شد. نتایج بدست آمده از qRT PCR افزایش قابل توجه در بیان miR-146a-5p پس از انجام عمل ترانسفکت را نشان داد که تاییدکننده صحیح و کارآمدبودن ترانسفکت بود.

[1] Yong Son Lee

[2] Janaiah

[3] Mirna

ماتریکس متالوپروتئیناز ۹- (MMP9) با رشد و پیشرفت تومور در سرطان کولورکتال (CRC) مرتبط است و به عنوان نشانگر زیستی در این سرطان پیشنهاد شده است [۲۹].

بسیاری از مطالعات انجام شده در مورد MMP9 در CRC بر همبستگی بیان آن در بافت و ویژگی‌های کلینیکوپاتولوژیک تومور متمرکز شده است و استفاده از آن به عنوان یک عامل پیش آگهی در رابطه با تشخیص و درمان از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۳۰]. میزان بیان MMP9 با استفاده از تکنیک qRT-PCR بررسی شد، نتایج نشان دهنده کاهش معنی‌دار بیان این مولکول در سلول‌های ترانسفکت شده با miR-146a-5p نسبت به سلول‌های کنترل بود.

این یافته همسو با نتایج مطالعه ای است که توسط هو[1] و همکاران بر روی سلول‌های سرطان پانکراس انجام گرفت، آن‌ها از طریق ترانسفکت miR-143 توسط وکتور آدنوویروسی بیان این miRNA را در سلول‌های سرطانی پانکراس افزایش دادند، بررسی‌های انجام گرفته با استفاده از تکنیک qRT-PCR کاهش بیان ژن MMP9 را به صورت چشمگیری در سلول‌های ترانسفکت شده نشان داد. این نتایج بیانگر ارتباط میان افزایش بیان miR-143 و کاهش مهاجرت و متاستاز به استخوان در سلول‌های مورد مطالعه بود [۳۱].

همچنین این مطالعه همسو با نتایج مطالعه گو[2] و همکاران است، در این مطالعه آنها مشاهده کردند که با افزایش بیان miR-324 در سلول‌های سرطان کولورکتال میزان بیان MMP9 و cancer invasion factors uPA به صورت قابل ملاحظه ای کاهش می‌یابد که سبب مهار رشد و تهاجم این سلول‌ها می‌شود [۳۲]. بنابراین افزایش بیان miR-146a-5p در سلول‌های HT-29 می‌تواند با هدف قراردادن MMP9 و مهار ترجمه آن باعث کاهش مهاجرت و متاستاز این سلول‌ها می‌شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و نتایج حاصل از مطالعاتی که در زمینه بازگردانی بیان miRNAهای تومورساپرسور در سرطان‌های مختلف انجام گرفته، به نظر می‌رسد که بازگردانی بیان miR-146a-5p به عنوان یک miRNA تومورساپرسور می‌تواند نقش مهمی در سرکوب سلول‌های سرطانی داشته باشد. در این تحقیق طی بررسی‌های انجام گرفته اثر تومورساپرسوری miR-146a-5p در رده سلولی HT-29 سرطان کولورکتال مشخص شد.

[1] Hu

[2] Gu

References

1- Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal cancer classification and cell heterogeneity: a systems oncology approach. Int J Mol Sci. 2015 Jun;16(6):13610-13632.

2- Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut. 2017 Apr;66(4):683-691.

3- Geramizadeh B. Molecular biomarkers of colorectal cancer: A Review of Published Articles from Iran. Ann Colorectal Res. 2015 September;3(3):11-20.

4- Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. Hum Mol Genet. 2006Apr;15(suppl_1):R17- R29.

5- Chawla JP, Iyer N, Soodan KS, Sharma A, Khurana SK, Priyadarshni P. Role of miRNA in cancer diagnosis, prognosis, therapy and regulation of its expression by Epstein–Barr virus and human papillomaviruses: with special reference to oral cancer. Oral Oncol. 2015 Aug;51(8):731-737.

6- Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. Mutat Res-Fund Mol M. 2011 Dec ;717(1):1-8.

7- Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. RNA Biol. 2013 Jun;10(6):924-33..
8- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006 Nov; (11):857-868.
9- Chitkara D, Mittal A, Mahato RI. miRNAs in pancreatic cancer: therapeutic potential, delivery challenges and strategies. Adv Drug Deliv Rev. 2015 Jan; 81:34-52..
10- Melo SA, Kalluri R. Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics. Clin Cancer Res. 2012 Jun; 18 (16): 4234-4239.
11- Cheng G. Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2015 Jan;81:75-93..
12- Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. Cancer Lett. 2013 Feb;329(2):125-136.
13- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell. 1993 Dec;75(5):855-862.
14- Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, Runfola T, Jones TL, Martin SE, et al. MicroRNAs and genomic instability. Semin Cancer Biol. 2007 Feb; 17(1): 65-73.
15- Cekaite L, Eide PW, Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA. MicroRNAs as growth regulators, their function and biomarker status in colorectal cancer. Oncotarget. 2016 Feb;7(6):64-76.
16- Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. Nat Rev Genet. 2011 Feb;12(2):99-109.
17- Thorsen SB, Obad S, Jensen NF, Stenvang J, Kauppinen S. The therapeutic potential of microRNAs in cancer. Cancer J. 2012 May;18(3):275-84.
18- Aslam MI, Patel M, Singh B, Jameson JS, Pringle JH. MicroRNA manipulation in colorectal cancer cells: from laboratory to clinical application. J Transl Med.. 2012 Dec;10(1):128-138.
19- Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, Perez J, Duc A, Dutour A, et al. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. Int J Cancer. 2011 Aug;129(3):680-690.
20- Leivonen SK, Sahlberg KK, Mäkelä R, Due EU, Kallioniemi O, Børresen-Dale AL, et al. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. Mol Oncol. 2014 Feb;8(1):93-104.
21- Lu D, Yao Q, Zhan C, Le-Meng Z, Liu H, Cai Y, et al. MicroRNA-146a promote cell migration and invasion in human colorectal cancer via carboxypeptidase M/src-FAK pathway. Oncotarget. 2017 Apr;8(14):67-42.
22- Sathyanarayanan A, Chandrasekaran KS, Karunagaran D. microRNA-146a inhibits proliferation, migration and invasion of human cervical and colorectal cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Nov;480(4):528-533.
23- Wuchty S, Arjona D, Bozdag S, Bauer PO. Involvement of microRNA families in cancer. Nucleic Acids Res. 2012 Jun;40(17):8219-8226.
24- Gambari R, Brognara E, Spandidos DA, Fabbri E. Targeting oncomiRNAs and mimicking tumor suppressor miRNAs: New trends in the development of miRNA therapeutic strategies in oncology. Int J Oncol. 2016 Jul;49(1):5-32.
25- Henry JC, Azevedo-Pouly AC, Schmittgen TD. MicroRNA replacement therapy for cancer. Pharm Res. 2011 Dec;28(12): 30-42.
26- Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M, Grünweller A, Hartmann RK, Aigner A. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. Pharm Res. 2011 Jun; 20: 46-54.
27- Orellana E, Kasinski A. MicroRNAs in cancer: a historical perspective on the path from discovery to therapy. Cancers. 2015 Sep;7(3):1388-405.
28- Bader AG. miR-34–a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. Front Genet. 2012 Jul;3:120-129.
29- Gopcevic K, Rovcanin B, Kekic D, Krivokapic Z, Dragutinovic V. Matrix Metalloproteinase-2 and-9, Lactate, and Malate Dehydrogenase and Lipid Peroxides in Sera of Patients with Colorectal Carcinoma. Folia Biol. 2017 Sep;63(5/6):190-196.

30- Liang S, Chang L. Serum matrix metalloproteinase-9 level as a biomarker for colorectal cancer: a diagnostic meta-analysis. Biomark Med. 2018 Apr;12(4):393-402.
31- Hu Y, Ou Y, Wu K, Chen Y, Sun W. miR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway. Tumor Biol.. 2012 Dec;33(6):1863-1870.
32- Gu C, Zhang M, Sun W, Dong C. Up-regulation of miR-324-5p inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer cells by targeting ELAVL1. Oncol Res. 2018 Jan; 158(2):201-202.