

MicroRNA-143 Inhibits Migration of Human Prostate Cancer Cells (PC3)

Bazhan E^{1,2}, Baradaran B^{3*}

1. Department of Genetic, East Azarbaijan Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Department of Genetic, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* Corresponding author. Tel: +984133371440, Fax: +984133371311, E-mail: Behzad_im@yahoo.com

Received: Dec 21, 2016

Accepted: May 20, 2017

ABSTRACT

Background & objectives: Prostate cancer is one the most common cancer in men whose incidence is increasing in many countries. According to the studies, decreased expression of miR-143 has been reported in prostate cancer. In this study, we replaced miRNA-143 in prostate cancer cells by vector based miRNA-143 and evaluated its inhibitory effects on migration of prostate cancer cells (PC3).

Methods: MTT assay was performed to reach an inhibitory concentration of Genticin antibiotic (G418) in PC3 cells. Then, miRNA-143 vector was transfected into PC3 cells via JetPEI transfection reagent. The transfected cells were selected by G418 antibiotic according to a 2-week treatment with IC50 concentration. Then, the expression level of miRNA-143 was measured by qRT-PCR method. To evaluate the effect of miRNA-143 in inhibition of migration, scratch wound healing assay was performed.

Results: Results of MTT assay showed the IC50 level of G418 on PC3 cells was obtained to be 141.9 µg / ml. The results of qRT-PCR indicated increased expression of miRNA-143 in PC3 cells transfected with miRNA-143 compared to control cells. Finally, the results of wound healing assay showed migration reduction in transfected cells compared with control cells (empty vector).

Conclusion: The results showed that miRNA-143 play an important role in cell migration during prostate cancer metastasis, and it can be a good candidate for molecular treatments.

Keywords: miRNA-143; Prostate Cancer; Metastasis; Transfection.

بررسی اثر جایگزینی miRNA-143 بر روی رده سلولی PC3 در مهار متاستاتیکی سرطان پروستات

*اکشن بازن^۱, **بهزاد برادران^{۲*}

۱. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، تبریز، ایران
 ۲. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز،
 ۳. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
 * نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۷۱۳۱۱ فاکس: ۰۴۱۳۳۷۱۳۱۱ پست الکترونیک: behzad_im@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین مردان است که بروز آن در بسیاری از کشورها در حال افزایش است. بر اساس مطالعات انجام شده کاهش بیان miRNA-143 در سرطان پروستات گزارش شده است. در این تحقیق با جایگزینی miRNA-143 در سلول‌های سرطان پروستات (PC3) از طریق انتقال ژن miRNA-143 توسط وکتور، بیان این میکرو RNA را در این سلول‌ها افزایش داده و اثرات این میکرو RNA در مهار متاستاز بررسی گردید.

روش کار: بعد از کشت سلول‌های سرطانی PC3 با استفاده از تست IC50 MTT آنتی‌بیوتیک G418 (Geneticin) در این رده سلولی به دست آورده شد. در ادامه با استفاده از JetPEI انتقال miRNA-143 به داخل سلول‌های سرطان پروستات صورت گرفت. از تست qRT-PCR برای تأیید عمل انتقال این میکرو RNA 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 آنتی‌بیوتیک G418 به دست آمد. نتایج حاصل از تست qRT-PCR افزایش بیان miRNA-143 در سلول‌های PC3 ترانسفکت شده با miRNA-143 نسبت به سلول‌های کنترل (وکتور خالی) نشان داد. در نهایت نتایج تست Wound healing کاهش مهاجرت سلول‌های ترانسفکت شده را در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که miRNA-143 نقش مهمی در مهار مهاجرت سلول‌های سرطان پروستات دارد و می‌تواند کاندید مناسبی برای درمان‌های مولکولی باشد.

واژه‌های کلیدی: miRNA-143، سرطان پروستات، متاستاز، ترانسفکشن

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۳۰

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۱

ترمیم کننده DNA و ژنهای مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز هستند [۲]. بیماری سرطان در برخی از کشورها به عنوان دومین علت مرگ‌ومیر و در ایران بعد از بیماری‌های قلبی-عروقی و سوانح و حوادث، به عنوان سومین عامل مرگ‌ومیر محسوب می‌شود. پنج سرطان شایع در هر دو جنس شامل سرطان‌های معده، مری، سینه، پروستات و کولون است [۳]. سرطان پروستات عموماً به صورت یکی از سرطان‌های بدخیم در

مقدمه

سرطان شامل گروهی از بیماری‌ها است که ویژگی مشترک و اصلی آن‌ها رشد سلولی تنظیم نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اولیه به سایر نقاط بدن است. سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها به وجود می‌آید که محصول عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی است [۱]. چهار دسته از ژنهای کلیدی که در هدایت سلول‌های سرطانی نقش دارند شامل انکوژن‌ها، ژنهای مهارکننده توموری، ژنهای

یکی از روش‌های درمانی استفاده از میکروRNAها است [۸,۹]. میکروRNAها برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط لی^۱ و همکاران به عنوان یک گروه از RNAهای غیرکدکننده ۲۱-۲۵ نوکلئوتیدی معرفی شدند. بیش از نصف میکروRNAهای شناخته شده، در نواحی شکننده کروموزوم قرار دارند که در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان مستعد حذف، اضافه و انتقال کروموزومی هستند، این مولکول‌ها چندین مسیر سلولی و متابولیسمی بدن را از طریق تنظیم ژن‌های هدف کنترل می‌کنند [۱۰,۱۱].

میکروRNAها زیرگروه بزرگی از RNAها هستند که از نظر تکاملی حفاظت شده می‌باشند. این مولکول‌ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه میکروRNAها یا القاء تجزیه آن‌ها کنترل می‌کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه -3' UTR انتهای میکروRNA انجام می‌دهند. بیوژنز میکروRNAها در هسته و سیتوپلاسم صورت II^۲ RNA پیمراز Pri-miRNA توسط میگردد. در ساختار Pri-miRNA رونویسی می‌شود، در انتهای pri-3' و کلاهک کپ^۳ در انتهای ۵' می‌باشد. pri-RNaseIII^۴ ابتدا در هسته توسط (دروشا^۵) miRNA به Pre-miRNA تبدیل می‌شود و بعد به سیتوپلاسم RNaseIII^۶ منتقل می‌شود، در سیتوپلاسم، توسط دیگری به نام دایسر^۷ پردازش نهایی میکروRNA انجام می‌گیرد. میکروRNAها از نظر عملکردی در سلول‌ها به دو دسته تومورسایپرسور و انکوژن تقسیم می‌شوند [۱۲].

میکروRNAهای سرکوب کننده توموری در سرطان پرستات همانند سایر سرطان‌ها شامل

مردان شناسایی شده است. پرستات به صورت غده کوچکی است که در زیر مثانه قرار گرفته و بخش بالی مجرای ادراری را فرا می‌گیرد. اگرچه به تازگی پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه پزشکی صورت گرفته اما سرطان پرستات همچنان شایع‌ترین بدخیمی در بین مردان می‌باشد. در کشورهای غربی سرطان پرستات دومین سرطان مرگ‌آور در مردان می‌باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده از هر ۶ مرد ۱ مرد مبتلا به سرطان پرستات است، همچنین مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که وراثت در ۱۰ درصد بروز سرطان پرستات دخیل است [۴,۵]. سرطان پرستات به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده سلامت مردان در جهان و دومین عامل مرگ مردان به علت سرطان در کشورهای توسعه یافته به شمار می‌رود که مهم‌ترین علت مرگ در اثر سرطان پرستات، متاستاز سرطان پرستات به استخوان می‌باشد. متاستاز سرطان به استخوان عملاً غیرقابل درمان بوده و دارای عوارض قابل توجهی قبل از مرگ بیمار می‌باشد [۶,۷]، به همین خاطر در ک مکانیسم متاستاز سرطان جهت جلوگیری از متاستاز و توسعه روش‌های درمانی ضد متاستاز برای کاهش عوارض ناشی از سرطان پرستات و مرگ‌ومیر، لازم و ضروری می‌باشد.

در سال‌های اخیر در تشخیص و درمان سرطان پرستات پیشرفت‌های چشمگیری صورت گرفته است. از روش‌هایی که برای درمان این سرطان بکار می‌رود می‌توان به شیمی‌درمانی، جراحی، رادیوتراپی و ایمونوتراپی اشاره کرد، اما این روش‌ها معایبی داشته و صد درصد موفقیت‌آمیز نمی‌باشند. از معایب این درمان‌ها عود مجدد بیماری، سایتوتوکسیک بودن روی سلول‌های غیر سرطانی، هزینه بالای درمان و عوارض جانبی آن‌ها است، به همین دلیل اخیراً محققین روش‌های مختلفی را برای درمان سرطان پرستات پیشنهاد نموده‌اند از جمله

¹ Lee

² RNAPOLII

³ Stem-Loop

⁴ CAP

⁵ Drosha

⁶ Dicer

آپوپتوز می‌شود [۱۵]. می‌توان این میکرو RNA را به عنوان یک هدف درمانی برای سرطان پروستات مطرح نمود و در اینجا روش جدیدی به نام microRNA Replacement Therapy مطرح می‌شود که در این روش با جایگزینی میکرو RNA در سلول‌های سرطانی از طریق انتقال ژن میکرو RNA در مورد نظر توسط وکتور، می‌توان بیان میکرو RNA را در سلول‌های سرطانی القاء کرد و میکرو RNA مورد نظر بیان ژن‌های هدف خود را به صورت طبیعی تنظیم نماید، در نتیجه منجر به مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطان پروستات شود.

از مزایای این روش می‌توان به طبیعی بودن مهار کننده‌ها و پایداری آن‌ها در بافت‌های نرمال بدن، کنترل چندین مسیر ایجاد سرطان و تعداد زیادی انکوژن اشاره کرد. همچنین به علت وجود تعداد فراوان این مولکول‌ها در سلول‌های نرمال عوارض جانبی کاهش می‌یابد و از طرفی باعث افزایش حساسیت سلول‌های توموری می‌گردد [۱۳, ۱۴].

روش کار کشت سلول

سلول‌های سرطانی PC3 از بانک سلولی انسنتیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI (Lot No. 1775866X.Gibco 1640 شرکت Lot No. 1775866X.Gibco ۱۰٪ سرم جنین گاوی^۲) (شرکت Gibco, NO.42Q7363) کشور آمریکا) استریل کشته شده به وسیله فیلترهای ۰/۲۲ میکرون، ۱٪ آتنی‌بیوتیک (پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml، استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml)، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱٪ سدیم پیروات کشت داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری گردیدند. تعویض محیط کشت هر ۳ روز یکبار انجام گرفت. پس از گذشت مدت زمان لازم و

میکرو RNA‌هایی می‌باشند که میزان بیان آن‌ها رابطه معکوس با سرعت و شدت سرطان دارند. طبق مطالعات انجام شده، از آنجایی که این میکرو RNA‌ها اهداف انکوژنیک بسیار مؤثر در مسیرهای پیام رسانی منتهی به رشد، تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی را مورد هدف قرار می‌دهند، در جلوگیری از ایجاد و نیز پیشرفت سرطان پروستات بسیار مؤثرند و نیز می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مختلف از آن‌ها برای درمان یا کنترل بیماری استفاده کرد. به عنوان مثال، می‌توان از RNA‌های دورشته ای سنتیکی استفاده نمود که مقلد میکرو RNA ضد توموری باشد و بتواند کمپلکس^۱ RISC را فعال سازد. همچنین می‌توان از ساختارهای سنجاق سری کوتاه که از پروموترهای pol III مشتق شده‌اند استفاده کرد که می‌تواند منجر به القای بیان دوباره میکرو RNA توسط سلول شود.

miRNA-143 روی کروموزوم شماره ۵ واقع شده است که یک ناحیه شکننده در ژنوم می‌باشد، این میکرو RNA برای اولین بار در موش شناسایی شد و بعد از مدت کوتاهی در انسان نیز شناسایی گردید. miRNA-143 به عنوان تنظیم کننده مهم و اساسی miRNA-143 در بیان ژن مطرح است. نقش miRNA-143 در سرطان یک بیومارکر سرطان روزبه‌روز در حال افزایش است، زیرا این میکرو RNA در حالت عادی می‌تواند رشد تومور را مهار کند.

در سرطان‌های سیستم گوارشی، ادراری و سیستم عصبی کاهش بیان miRNA-143 گزارش شده است. در سرطان پروستات نیز بیان این میکرو RNA کاهش می‌یابد. این میکرو RNA از طریق تنظیم بیان ژن‌های مختلفی مانند MMP-9, K-RAS, c-Myc در فرایندهای تکثیر، تمایز، بقا، آپوپتوز و متاستاز نقش دارند [۱۳, ۱۴].

از آنجا که کاهش بیان miRNA-143 در سرطان پروستات باعث افزایش تکثیر و متاستاز و کاهش

² Fetal Bovine Serum

^۱ RNA-Induced Silencing Complex

میکرولیتر از بافر سورنسون^۳ به هر چاهک افزوده گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط مشابه نگهداری شد. سپس پلیت‌ها در دستگاه الیزا ریدر قرار داده شده و تغییر رنگ چاهک‌ها با طول موج ۵۷۰/۶۳۰ نانومتر سنجیده شد.

انتقال ژن

برای انجام انتقال ژن ابتدا عمل شمارش سلول‌های PC3 انجام شد و به تعداد 3×10^5 سلول در ۲ خانه از پلیت ۶ تایی توزیع شد به طوری که یک خانه جهت miRNA-143 hsa- ترانسفکت با وکتور حامل ژن OriGene miRNA-143 (خریداری شده از شرکت miRNA-143 کشور آمریکا) تحت عنوان Vec+ و یک خانه جهت کنترل (وکتور خالی) کشت داده شد. پلیت را به انکوباتور انتقال داده و پس از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌های موجود در پلیت از لحاظ چسبیدن به کف پلیت و رسیدن سلول‌ها به تعداد مورد نظر برای انتقال ژن بررسی گردید. برای انتقال ژن ۲ عدد میکروتیوب استریبل برای وکتور + و کتور حاوی miRNA-143 آماده شد. در ادامه طبق پروتکل jetPEI® in vitro DNA Transfection Protocol JetPEI[®] ۱μg/ml (Polyplus[®] lot No. 1502C1ZF) کشت (فرانسه) که یک محلول انتقال یا ترانسفکت DNA به داخل سلول‌ها می‌باشد اضافه شد و با $94 \mu\text{m}$ NACL ۱ lot، کشور فرانسه) به حجم $100 \mu\text{l}$ رسانده شد. سپس با توجه به اینکه در پروتکل غلظت توصیه شده DNA و کتور حامل ژن miRNA-143 برای انجام ترانسفکت ۶۰۰۰ نانوگرم بود در میکروتیوب دوم حجم مورد نیاز محاسبه شد و با NACL به حجم $100 \mu\text{l}$ رسانده شد، این میکروتیوب با میکروتیوب اول مخلوط شده و روی سلول‌ها اضافه شد. به خانه دوم هم که جهت کنترل بود ۲ml RPMI ۱۰% FBS محیط کشت با اضافه گردید.

³ Sorensen Phosphate Buffer

رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰۰ درصد؛ سلول‌ها جهت انجام تست‌های مورد نظر استفاده گردیدند. تست MTT جهت تعیین IC50 دوز مناسب آنتی‌بیوتیک (G-418) Geneticin

در این آزمایش از نمک زرد رنگ تترازولیوم استفاده می‌گردد، به طوری که ابتدا به تعداد ۱۵۰۰۰ سلول PC3 را همراه با محیط کشت RPMI1640 و سرم جنین گاوی ۱۰٪ در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی توزیع گردید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و $1200 \mu\text{g}/\text{ml}$ از پودر آنتی‌بیوتیک Lot No.1743630.Gibco Geneticin (کشور آمریکا) تیمار گردید. برای افزایش دقیق آزمایشات، افزودن هر دوز از آنتی‌بیوتیک به صورت سه تایی^۱ صورت گرفت. بعد از اضافه کردن آنتی‌بیوتیک G418 (Polyplus[®] lot No. 2259817) به پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ۷۲ ساعت بعد محیط رویی به آرامی جمع‌آوری و دور ریخته شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر PBS (کشور آمریکا) جهت شستشو اضافه گردید و سپس PBS دور ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT (کشور کانادا) Bio Towlid (lot No.DU21373R2.Basic) به هر چاهک RPMI1640 و سرم جنین گاوی ۱۰٪ (کشور کانادا) به اضافه گردید و ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری شد. در مرحله بعد محلول رویی به آرامی خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر از دی‌متیل سولفوکسید^۲ AppliChem (DMSO) (کشور آلمان) به همراه LotNo.8S011641 با ۲۵

¹ Triplicate

² Dimethylsulfoxide (DMJSO)

گردید تا اثر ایزوپروپانول از بین برود، بعد از اتمام ۲ مرحله شستشو مایع رویی میکروتیوبها به طور کامل دور ریخته شد و فقط رسوب RNA ها داخل میکروتیوبها باقی ماند، بعد از خشک شدن به هر کدام از میکروتیوبها به اندازه $1\text{ }\mu\text{m}$ محلول Nuclease free water (شرکت Lot EXIQON No.00181198، کشور دانمارک) ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس در دمای ۸۰- نگهداری گردید.

سنتز cDNA

در این مرحله سنتز cDNA بر اساس کیت EXIQON انجام گرفت. ابتدا غلظت RNA استخراج شده به وسیله دستگاه Nano Drop 2000c (شرکت Thermo کشور آمریکا) اندازه گیری شد. سپس طبق RNA ۵ ng/ μl مقدار $1\text{ }\mu\text{l}$ پروتکل جیت سنتز cDNA مورد نیاز بود که بر اساس غلظت نمونه های موجود و بستن تناسب مقداری از نمونه ها که باید برای سنتز استفاده شود مشخص گردید و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه و به سرعت در ۴ درجه در دستگاه RT-PCR (شرکت BioRad مدل T100 Thermal Cycle) قرار داده شد تا پیچیدگی ها، سنجاق سرها و کلمپ های RNA از هم باز شده و تک رشته ای شوند تا پرایمیر به درستی در جای خود قرار گیرد، پس از اتمام مدت زمان سنتز نمونه ها بر چسب گذاری شده و در -20°C درجه برای مدت زمان کوتاه نگهداری گردید. برای مدت زمان های بیشتر باید در -80°C نگهداری شود.

MicroRNA Gene qRT-PCR

بعد از سنتز cDNA میزان بیان miRNA-143 به وسیله qRT-PCR اندازه گیری شد. به طوری که ابتدا cDNA ها طبق پروتکل ۱ به 80°C رقیق سازی شد، سپس از cDNA های رقیق شده $1\text{ }\mu\text{l}$ به میکروتیوب های مخصوص qRT-PCR انتقال داده

با توجه به آنکه وکتور حاوی نشانگر ژن مقاومت به آنتی بیوتیک Geneticin (G418) می باشد؛ پس از ۲۴ ساعت برای گزینش سلول های دریافت کننده وکتور از محیط کشت کامل استفاده شد. طبق پروتکل تعویض محیط کشت و اضافه کردن آنتی بیوتیک تا گزینش کامل سلول ها ادامه یافت.

پس از گذشت چندین روز و مرگ سلول های فاقد وکتور حاوی ژن miRNA-143 در اثر آنتی بیوتیک (G418) و افزایش سلول های دریافت کننده وکتور حاوی ژن miRNA-143 که مقاوم به آنتی بیوتیک هستند، سلول های موجود در پلیت پس از رسیدن به حد نصاب و پر کردن کامل کف پلیت؛ از پلیت ها تریپسینه و جدا گردید و به فلاسک های ۲۵ml انتقال داده شد. تعویض محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک طبق پروتکل به مدت ۱۴ روز ادامه یافت.

استخراج RNA

بعد از اتمام مرحله ۱۴ روزه ای انتقال ژن سلول های PC3 با وکتور حاوی ژن miRNA-143 و گزینش سلول های دریافت کننده این وکتور توسط آنتی بیوتیک (G418) و رسیدن سلول ها به تعداد مورد نیاز؛ عمل استخراج RNA از سلول های ترانسفکت شده PC3 انجام شد. استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول با نام تجاری Riboex (شرکت Riboex NO. Gene All، کشور کره) انجام گرفت. برای فرآیند استخراج RNA پس از تریپسینه کردن و به دست آوردن رسوب سلولی مطابق دستورالعمل به هر کدام به اندازه 1 ml محلول RiboEx (شرکت RiboEx NO. REX15J12014، کشور کره) که یک محلول استخراج کننده RNA است اضافه شد، سپس با استفاده از کلروفرم 3 ml لایه ایجاد شد که لایه شفاف بالایی حاوی RNA سلول ها است، که با سمپلر و با دقت جدا شده و با ایزوپروپانول رسوب داده شد. در ادامه با 1 ml لیتر الکل 75% شستشو

سلول‌ها با PBS^۳ شستشو داده شدند. تصاویر مهاجرت سلول‌ها به خراش ایجاد شده در زمان ۰ ساعت، ۶ ساعت، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۹۶ ساعت با میکروسکوپ معکوس (شرکت Optika مدل ۳ XDS_کشور ایتالیا) عکس برداری گردید.

آنالیز آماری

به جهت تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده از آزمایشات ذکر شده، نرم افزار Graph Pad Prism 6 استفاده گردید. برای تعیین تغییرات متغیر RNA بین گروه‌های کنترل و تراریخت شده با میکرو One-way t test (آنالیز واریانس یکطرفه) Two-way ANOVA و ANOVA سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتیجه کشت سلولی

پس از دفریز کردن رده سلولی PC3 و انتقال به محیط کشت درون فلاسک، و چندین سری پاساز دادن، سلول‌ها در فاز لگاریتمی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱. عکس سلول‌های PC3 با بزرگنمایی ۴۰

نتایج MTT جهت تعیین دوز مناسب آنتی‌بیوتیک (G418) Geneticin

برای به دست آوردن IC₅₀ آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) تست MTT انجام گرفت. سلول‌ها با

^۳ Phosphate-Buffered Saline

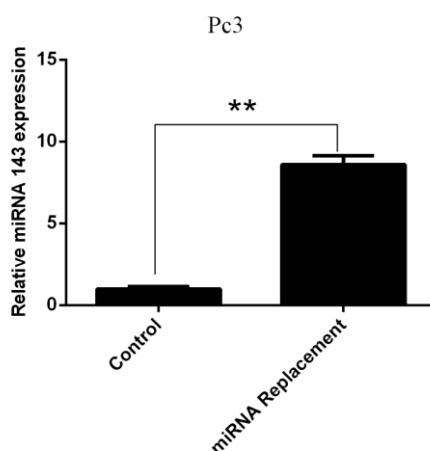
شد، سپس به هر یک از میکروتیوب‌ها مقدار ۱ μl SYBR Green dNTP Master شامل (شرکت EXIQON کشور دانمارک) Lot No. 203421 اضافه شده و همچنین ۱ μl پرایمر- hsa-miRNA Primer mix (شرکت EXIQON ID:204483 کشور دانمارک) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به دستگاه Light Cycle 96 (شرکت Roche SN:11769 REF:05815916001) با ۱ J طبق کشور آلمان) انتقال داده شد و برنامه آن را طبق پروتکل به صورت ۱۰ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و ۲step به صورت ۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد طی ۴ سیکل و در پایان سیکل مرحله ذوب^۱ تنظیم گردید. در این روش کمی میزان فلورسانس تولید شده miRNA-143 بر اساس میزان DNA اندازه‌گیری می‌شود. در اینجا در طول تکثیر cDNA اندازه‌گیری می‌شود. در اینجا از رنگ اینترکاله شونده با SYBR green استفاده شد و میزان فلورسانس ایجاد شده در طی سنتز DNA دو رشته‌ای توسط دستگاه qRT-PCR ثبت گردید. در این روش از SNORD 48 (شرکت EXIQON کشور دانمارک) به عنوان ژن کنترل داخلي^۲ در کنترل بررسی بیان ژن میکرو RNA پس از انتقال استفاده شد. در پایان داده‌ها با مقایسه مقادیر CT آنالیز شد.

تست Wound Healing

در این مرحله یک روز قبل از خراش، رده سلولی PC-3 که شامل سلول‌های کنترل و Vec+ بودند را به طور جداگانه تریپسینه کرده و در یک پلیت ۶ خانه‌ای به صورت یکنواخت و به اندازه 5×10^5 سلول برای هر خانه کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد و پس از رسیدن سلول‌ها به تلاقی کامل و تشکیل یک تک لایه سلولی همگن کف پلیت با یک نوک سر سمپلر استریل تیپ ۱۰۰ mL خراش داده شد، سپس

^۱ Melting

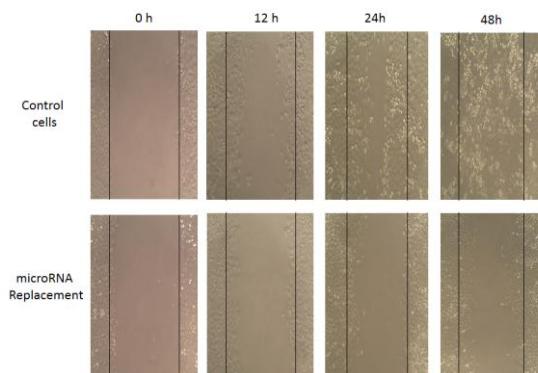
^۲ Housekeeping



نمودار ۲. میزان بیان miRNA-143 در گروه کنترل و گروه ترانسفکت شده را نشان می‌دهد. ** افزایش بیان میکرو RNA با $P < 0.05$ نشان می‌دهد.

نتایج تست پهپود خراش^۱

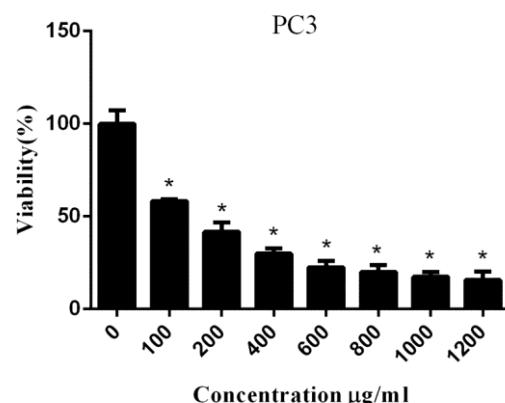
برای ارزیابی اثر افزایش بیان miRNA-143 در مهاجرت سلول‌های رده سلولی PC3 تست Wound healing یا تست خراش انجام گرفت. بررسی نتایج این تست به صورت مجموعه‌ای از عکس‌ها است که در ساعت ۰-۱۲-۲۴-۴۸ از میزان مهاجرت سلول‌ها تهیه و گردآوری شده است. مقایسه آن‌ها به صورت مشخص کاهش مهاجرت سلول‌ها را پس از جایگزینی Vec+ نشان می‌دهد. در این تست از آزمون آماری Two-way ANOVA برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید (شکل ۲).



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

^۱ Wound Healing Assay

دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ تیمار گردیدند و IC_{50} به دست آمده برای سلول‌های PC3 $141.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ بود. به طوری که پس از انتقال ژن به سلول‌ها به منظور تمایز سلول‌های ترانسفکت شده و سلول‌های کنترل (وکتور خالی) از این دوز استفاده گردید. در این تست از آزمون آماری One-way ANOVA برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. نتایج در نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار ۱. زنده ماندن سلول‌ها در دوزهای مختلف آنتی‌بیوتیک G418 را نشان می‌دهد. * کاهش زنده بودن سلول‌ها را با $P < 0.05$ نشان می‌دهد.

نتایج تأثیر جایگزینی ژن miRNA-143 بر میزان بیان این ژن

پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، میزان بیان ژن miRNA-143 در گروه کنترل و گروه تراژن شده (vec+) توسط آزمایش qRT-PCR ارزیابی گردید. نتایج افزایش بیان این میکرو RNA را در گروه ترانسفکت شده نشان داد. در این تست از آزمون آماری t test برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید (نمودار ۳).

نشان داد که miRNA-143 به عنوان یک سرکوبگر تومور و سرکوب تکثیر و عامل ترویج آپوپتوز می‌باشد. از این رو می‌توان miRNA-143 را به عنوان یک هدف درمانی برای سرطان پروستات مطرح نمود.

در میان روش‌های متعدد برای انتقال ژن روش جدیدی به نام درمان با جایگزینی میکرو RNA^۱ در سال‌های اخیر مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این روش با جایگزینی میکرو RNA در سلول‌های سرطانی از طریق انتقال ژن میکرو RNA مورد نظر توسط وکتور، می‌توان بیان میکرو RNA را در سلول‌های سرطانی القاء کرد [۱۳].

در یکی از مطالعات اخیر نشان داده شده است که miRNA-143 از پیشرفت سرطان پروستات در EMT موش‌ها با تداخل در پیام رسانی در مسیر جلوگیری می‌کند [۲۰, ۳۱].

روش درمانی که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت تکنیک درمان با جایگزینی میکرو RNA است که در این تکنیک بیان میکرو RNA تومورسپرسور ۱۴۳ در سلول‌های سرطانی پروستات القاء می‌شود. در این مطالعه پس از جایگزینی miRNA-143، آنچه که با دستگاه imaging reader موفقیت‌آمیز بودن روش انتقال miRNA-143 با استفاده از پروتکل jetPEI بود.

همچنین به دلیل اینکه وکتور مورد استفاده در این مطالعه دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک G-418 (Geneticin) می‌باشد، محققین در کشت سلولی با توجه به IC₅₀ به دست آمده از دوز مناسب این آنتی‌بیوتیک استفاده کردند. پس می‌توان گفت که فقط سلول‌های دریافت کننده پلاسمید قادر به ادامه حیات در محیط کشت حاوی G-418 بوده و بقیه سلول‌ها اکثرًا از بین رفته و حذف شدند.

بحث

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین مردان است که بروز آن در بسیاری از کشورهای توسعه یافته در حال افزایش است [۱۶]. غربالگری و درمان سرطان پروستات در مراحل اولیه یکی از چالش برانگیزترین و بحث برانگیزترین مسائل در علم پزشکی می‌باشد. عوامل بسیاری در بروز سرطان پروستات دخیل است، مشکل اصلی ناشی از سرطان پروستات (PCA) گرایش آن در متاستاز به استخوان است. متاستاز استخوان طی کالبد شکافی در ۹۰ درصد بیمارانی که با سرطان پروستات می‌مرند مشخص شده است [۱۷, ۱۸]. میکروRNA‌ها نقش بسیار مهمی در متاستاز سرطان بازی می‌کنند. ۲۱-۲۵ میکروRNA‌ها مولکول‌های کوچک RNA نوکلئوتیدی هستند که با اتصال به میکرو RNA هدف در تنظیم بیان ژن نقش اساسی دارند. مشاهدات نشان داد که بیان میکروRNA‌ها در بافت‌های توموری بالاتر است که این یافته منجر به بیان این نظریه شد که میکروRNA‌ها در تمایز سلولی نقش دارند. کاهش بیان بعضی از آنها نیز نقش مهمی در شروع و پیشرفت تومور دارد. الگوی بیان میکروRNA‌ها به ارتباط نزدیکی با تمایز سلولی دارد. این RNA‌ها به دو دسته مهارکننده تومور و انکوژن دسته‌بندی شده‌اند. یکی از میکروRNA‌های تومورسپرسور که در سرطان پروستات دچار کاهش بیان می‌شود miRNA-143 می‌باشد، با توجه به بررسی‌های انجام شده بیان miRNA-143 به طور قابل توجهی در سرطان اولیه پروستات در مقایسه با سایر بافت‌های نرمال پروستات کاهش یافته است [۱۹, ۲۰]. همچنین کاهش بیان miRNA-143 در بسیاری از نمونه‌های توموری از جمله سرطان پستان، معده، کبد، ریه، مثانه، هیپوفیز، روده بزرگ و تخمدان گزارش شده است [۲۱-۲۸]. در نتیجه کاهش بیان این میکروRNA باعث افزایش متاستاز می‌شود [۲۹, ۳۰]. این مطالعات

^۱ microRNA Replacement Therapy

مکانیسم کاهش متاستاز از طریق هدف قرار دادن CD44 صورت گرفت [۳۴].

نتایج بررسی مطالعه حاضر مشخص نمود که با توجه به تست خراش افزایش بیان miRNA-143 باعث کاهش مهاجرت و متاستاز سلول‌های vec+ (وکتور حامل ژن miRNA-143) نسبت به سلول‌های کنترل رده سلولی PC3 در سرطان پروستات می‌شده و قابلیت تومورزایی کاهش می‌یابد.

به طور خلاصه یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که miRNA-143 می‌تواند به عنوان یک عامل در جلوگیری از متاستاز سرطان پروستات باشد و یکی از اهداف درمانی در سرطان پروستات باشد.

نتیجه گیری

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در بین مردان است که بروز آن در بسیاری از کشورها در حال افزایش است. با توجه به مطالعات انجام شده بیان miRNA-143 در رده‌ی سلولی PC3 سرطان پروستات کاهش می‌یابد. در این تحقیق محققین با جایگزینی miRNA-143 در سلول‌های سرطان miRNA-143 پروستات (PC3) از طریق انتقال ژن miRNA-143 در این سلول‌ها افزایش یافته و اثرات این میکرو RNA در مهار متاستاز نشان داده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که miRNA-143 نقش مهمی در مهاجرت سلول‌های سرطان پروستات دارد و می‌تواند کاندید مناسبی برای درمان‌های مولکولی باشد.

نتایج حاصل از qRT-PCR مشخص نمود که سطح بیان miRNA-143 پس از جایگزینی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است که این نشانگر صحیح بودن انتقال ژن می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۰۸ توسط کربیشر^۱ و همکاران انجام گرفت. آنها برای اولین بار ثابت کردند که بازگرداندن سطح بیان Let-7 باعث مهار سرطان ریه در موش‌های مدل سرطان ریه می‌گردد. این تحقیق نشان داد که Let-7 در سرطان ریه عملکرد تومورسپرسوری دارد و همچنین نشان داد که Let-7 پتانسیل درمانی در درمان سرطان ریه دارد [۳۲].

همچنین اولین یافته در مورد نقش miRNA-143 در سرطان پروستات وقتی مشاهده شد که بیان آن در رده‌های سلولی LNCap, C4-2 در مقایسه با رده‌های سلولی نرمال اپی تلیالی کاهش پیدا کرد که این یافته با تکنیک qRT-PCR ارزیابی شد، بیان miRNA-143 در سرطان پروستات کاهش پیدا می‌کند، بنابراین سطح miRNA-143 ترجمه شده ارتباط معکوسی با درجه هیستوپاتولوژیکی در سرطان پروستات دارد [۳۳].

نتایج تحقیقاتی که کینگ پینگ^۲ و همکاران بر روی بافت سرطانی ریه انجام دادند، نشان داد که miRNA-143 مهاجرت و تهاجم را در بافت‌های سرطان ریه کاهش می‌دهد. بر اساس این تحقیق

¹ Kerscher

² Qingping

References

- 1-Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics, 3th ed. New York: Oxford university press. 2012: 52-62.
- 2-Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. Semin Cancer Biol. 2008 Oct; 18(5): 372-377.
- 3-Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. Arch Iran Med. 2010 Mar;13(2):143-6.
- 4-Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin. 2005 Jan-Feb;55(1):10-30.

- 5-Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr; 49(6): 1374-1403.
- 6-Roodman, G.D. Mechanisms of bone metastasis. *New Engl J Med*. 2004 Apr; 350(16): 1655-1664.
- 7-Mundy, G.R. Metastasis: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):584-93.
- 8-Shah RB, Mehra R, Chinnaiyan AM, Shen R, Ghosh D, Zhou M, et al. Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases lessons from a rapid autopsy program. *Cancer Res*. 2004 Dec; 64(24): 9209-9216.
- 9-Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*. 2010 Sep; 70(18): 7027-7030.
- 10-Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993 Dec; 75(5): 843-854.
- 11-MacFarlane LA, R Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*. 2010 Nov; 11(7): 537-561.
- 12-Bader AG, Lammers P. The therapeutic potential of microRNAs. *Ipp Techno*. 2011 Apr: 52-55.
- 13-Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, Naoe T, Akao Y. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. *Mol Cancer*. 2010 Jun 2;9:136.
- 14-Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, Yang L, Zhou B, Gu J, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31,-143 and-145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers*. 2009;26(1):27-34.
- 15-Zhou P, Chen W-G, Li X-W. MicroRNA-143 acts as a tumor suppressor by targeting hexokinase 2 in human prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2015 May; 5(6): 2056.
- 16-Chen R, Ren S, Yiu MK, Fai NC, Cheng WS, Ian LH, et al. Prostate cancer in Asia: a collaborative report. *AJUR*. 2014 Oct; 1(1): 15-29.
- 17-Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA-Cancer J Clin*. 2007 Jan; 57(1): 43-66.
- 18-Rubin MA, Putzi M, Mucci N, Smith DC, Wojno K, Korenchuk S, et al. Rapid ("warm") autopsy study for procurement of metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 Mar; 6(3): 1038-1045.
- 19-Fu X, Xue C, Huang Y, Xie Y, Li Y. The activity and expression of microRNAs in prostate cancers. *Mol Biosyst*. 2010 Dec; 6(12): 2341-2576.
- 20-Clapé C, Fritz V, Henriet C, Apparailly F, Fernandez PL, Iborra F, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PloS one*. 2009 Oct; 4(10): e7542.
- 21-Götte M, Mohr C, Koo C, Stock C, Vaske A, Viola M, et al. miR-145-dependent targeting of junctional adhesion molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene*. 2010 Sep; 29(50): 6569-6580.
- 22-Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, Naoe T, Tanigawa N, Akao Y. Decreased expression of microRNA-143 and-145 in human gastric cancers. *Oncology*. 2009 Jul; 77:12-21
- 23-Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007 Dec; 47(4): 1223-1232.
- 24-Liu X, Sempere LF, Galimberti F, Freemantle SJ, Black C, Dragnev KH, et al. Uncovering growth-suppressive MicroRNAs in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb; 15(4): 1177-1183.
- 25-Dyrskjøt L, Ostenfeld MS, Bramsen JB, Silahtaroglu AN, Lamy P, Ramanathan R, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res*. 2009 Jun; 69(11): 4851-4860.
- 26-Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Neder L, Machado HR, Silva Jr WA, et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jan; 94(1): 320-323.
- 27-Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2690-5.
- 28-Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2009 Oct 20;9:374.

- 29-Ng E, Tsang W, Ng S, Jin H, Yu J, Li J, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Brit J Cancer*. 2009 Jul; 101(4): 699-706.
- 30-Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. 2009 Jan; 28(10): 1385-1392.
- 31-Zhou C, Nitschke AM, Xiong W, Zhang Q, Tang Y, Bloch M, et al. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Breast Cancer Res*. 2008;10(6):R105.
- 32-Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, et al. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell cycle*. 2008 Apr; 7(6): 759-764.
- 33-Xu B, Niu X, Zhang X, Tao J, Wu D, Wang Z, et al. miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS. *Mol Cell Biochem*. 2011 Apr; 350(1-2): 207-213.
- 34-Mukherjee D, Zhao J. The role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*. 2013;3(1):46-57.