

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

Bazhan E<sup>1,2</sup>, Baradaran B<sup>3\*</sup>

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 Gentamicin 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

اتلشن باژن<sup>۱،۲</sup>، بهزاد برادران<sup>۳\*</sup>

۱. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، تبریز، ایران ۲. گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز،

تبریز، ایران ۳. مرکز تحقیقات ایمنونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۷۱۳۱۱ فاکس: ۰۴۱۳۳۳۷۱۳۱۱ 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 MTT، IC50 آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) 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 برای آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) به دست آمد. نتایج حاصل از تست qRT-PCR افزایش بیان miRNA-143 را 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

### 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

ترمیم‌کننده DNA و ژن‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده 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 معمولاً به‌صورت یکی از سرطان‌های بدخیم در

مردان شناسایی شده است. پروستات به صورت غده کوچکی است که در زیر مثانه قرار گرفته و بخش بالایی مجرای ادراری را فرا می‌گیرد. اگرچه به‌تازگی پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه پزشکی صورت گرفته اما سرطان پروستات همچنان شایع‌ترین بدخیمی در بین مردان می‌باشد. در کشورهای غربی سرطان پروستات دومین سرطان مرگ‌آور در مردان می‌باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده از هر ۶ مرد ۱ مرد مبتلا به سرطان پروستات است، همچنین مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که وراثت در ۱۰ درصد بروز سرطان پروستات دخیل است [۵، ۸]. سرطان پروستات 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 پروستات، متاستاز سرطان پروستات 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 درک مکانیسم متاستاز سرطان جهت جلوگیری از متاستاز و توسعه روش‌های درمانی ضد متاستاز برای کاهش عوارض ناشی از سرطان پروستات و مرگ‌ومیر، لازم و ضروری می‌باشد.

در سال‌های اخیر در تشخیص و درمان سرطان پروستات 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 در صد 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 پروستات پیشنهاد نموده‌اند از جمله

یکی از روش‌های درمانی استفاده از میکروRNAها است [۹، ۸]. میکروRNAها برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط لی<sup>۱</sup> و همکاران به عنوان یک گروه از RNAهای غیرکدکننده ۲۵-۲۱ 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 [۱۱، ۱۰].

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 می‌گیرد. Pri-miRNA توسط RNA پلیمراز II<sup>۲</sup> رونویسی می‌شود، Pri-miRNA ساختار سنجاق‌سری<sup>۳</sup> داشته که دارای دم poly A در انتهای 3' و کلاهک کپ<sup>۴</sup> در انتهای 5' می‌باشد. Pri-miRNA ابتدا در هسته توسط (دروشا)<sup>۵</sup> RNaseIII به Pre-miRNA تبدیل می‌شود و بعد به سیتوپلاسم منتقل می‌شود، در سیتوپلاسم، توسط RNaseIII دیگری به نام دایسر<sup>۶</sup> پردازش نهایی میکروRNA انجام می‌گیرد. میکروRNAها از نظر عملکردی در سلول‌ها به دو دسته تومورسپرسور و انکوژن تقسیم می‌شوند [۱۲].

میکروRNAهای سرکوب کننده توموری در سرطان پروستات همانند سایر سرطان‌ها شامل

<sup>1</sup> Lee

<sup>2</sup> RNAPOLII

<sup>3</sup> Stem-Loop

<sup>4</sup> CAP

<sup>5</sup> Drosha

<sup>6</sup> Dicer

آپوتوز می‌شود [۱۵]، می‌توان این میکرو RNA را به‌عنوان 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 مورد نظر توسط وکتور، می‌توان بیان میکرو RNA را در سلول‌های سرطانی القاء کرد و میکرو RNA مورد نظر بیان ژن‌های هدف خود را به‌صورت طبیعی تنظیم نماید، در نتیجه منجر به مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطان پروستات شود.

از مزایای این روش می‌توان به طبیعی بودن مهارکننده‌ها 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 انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI 1640 (شرکت Gibco، Lot No. 1775866X) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS<sup>۲</sup>) (شرکت Gibco، Lot NO.42Q7363، کشور آمریکا) استریل شده به‌وسیله فیلترهای ۰/۲۲ میکرون، ۱٪ آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین 100 IU/ml، استرپتومایسین 100 μg/ml)، ۲ میلی‌مولار گلوتامین و ۱٪ سدیم پیروات کشت داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 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 پیام‌رسانی 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. به‌عنوان مثال، می‌توان از RNA‌های دورشته‌ای سنتتیک استفاده نمود که مقلد میکرو RNA ضد توموری باشد و بتواند کمپلکس RISC<sup>۱</sup> را فعال سازد. همچنین می‌توان از ساختارهای سنجاق‌سری کوتاه که از پروموتورهای 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 به‌عنوان تنظیم‌کننده مهم و اساسی در بیان ژن مطرح است. نقش miRNA-143 به‌عنوان 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 فرایندهای تکثیر، تمایز، بقا، آپتوز و متاستاز نقش دارند [۱۳، ۱۴].

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

<sup>۲</sup> Fetal Bovine Serum

<sup>۱</sup> RNA-Induced Silencing Complex

میکرولیتر از بافر سورنسون<sup>۳</sup> به هر چاهک افزوده گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط مشابه نگهداری شد. سپس پلیت‌ها در دستگاه الیزاریدر 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  $3 \times 10^5$  سلول در ۲ خانه از پلیت ۶ تایی توزیع شد به طوری که یک خانه جهت ترانسفکت با وکتور حامل ژن hsa-miRNA-143 (OriGene (خریداری شده از شرکت 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 استریل برای وکتور + (وکتور حاوی miRNA-143) آماده شد. در ادامه طبق پروتکل jetPEI® in vitro DNA Transfection Protocol JetPEI 1µ6 در داخل یکی از میکروتیوب‌ها (شرکت lot No. 1502C1ZF, Polyplus) کشور فرانسه) که یک محلول انتقال یا ترانسفکت DNA به داخل سلول‌ها می‌باشد اضافه شد و با  $1 \mu 94$  NaCl (شرکت lot No. N130925, Polyplus) کشور فرانسه) به حجم  $1 \mu 100$  رسانده شد. سپس با توجه به اینکه در پروتکل غلظت توصیه شده DNA وکتور حامل ژن miRNA-143 برای انجام ترانسفکت ۶۰۰۰ نانوگرم بود در میکروتیوب دوم حجم مورد نیاز محاسبه شد و با NaCl به حجم  $1 \mu 100$  رسانده شد، این میکروتیوب با میکروتیوب اول مخلوط شده و روی سلول‌ها اضافه شد. به خانه دوم هم که جهت کنترل بود 2ml محیط کشت RPMI با ۱۰٪ FBS اضافه گردید.

رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ الی ۸۰ درصد؛ سلول‌ها جهت انجام تست‌های مورد نظر استفاده گردیدند.

#### تست MTT جهت تعیین IC50 دوز مناسب آنتی‌بیوتیک Geneticin (G-418)

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 سانتی‌گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ µg/ml از پودر آنتی‌بیوتیک Geneticin (شرکت Lot No. 1743630, Gibco) (کشور آمریکا) تیمار گردید. برای افزایش دقت آزمایشات، افزودن هر دوز از آنتی‌بیوتیک به صورت سه تایی<sup>۱</sup> صورت گرفت. بعد از اضافه کردن آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418)، 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 (شرکت Lot No. 2259817, Gibco) کشور آمریکا) جهت شستشو اضافه گردید و سپس PBS دور ریخته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT (شرکت Bio Lot No. DU21373R2, Basic) تولید کشور کانادا) همراه با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل (RPMI1640 و سرم جنین گاوی ۱۰٪) به هر چاهک افزوده و ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری شد. در مرحله بعد محلول رویی به آرامی خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر از دی‌متیل سولفو کسید<sup>۲</sup> (DMSO) (شرکت AppliChem) با LotNo. 8S011641 (کشور آلمان) به همراه ۲۵

<sup>۱</sup> Triplicate

<sup>۲</sup> Dimethylsulfoxid (DMISO)

<sup>۳</sup> Sorensen Phosphate Buffer

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 30µl محلول Nuclease free water (شرکت Lot No.00181198, EXIQON 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 ی MicroRNA

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 پروتکل جهت سنتز cDNA مقدار 5 ng/µl RNA مورد نیاز بود که بر اساس غلظت نمونه‌های موجود و بستن تناسب مقداری از نمونه‌ها که باید برای سنتز استفاده شود مشخص گردید و سپس به مدت 60 دقیقه در دمای 42 درجه و 5 دقیقه در دمای 95 درجه و به سرعت در 4 درجه در دستگاه RT-PCR (شرکت BioRad مدل T100 Thermal Cycle با SN 621BR141187 کشور آمریکا) قرار داده شد تا پیچیدگی‌ها، سنجاق‌سرها و کلمپ‌های 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 نمونه‌ها برچسب گذاری شده و در ۲۰- درجه برای مدت زمان کوتاه نگهداری گردید. برای مدت‌زمان‌های بیشتر باید در ۸۰- 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 cDNAها طبق پروتکل ۱ به ۸۰ رقیق سازی شد، سپس از cDNAهای رقیق شده 4µl به میکروتیوب‌های مخصوص qRT-PCR انتقال داده

با توجه به آنکه وکتور حاوی نشانگر ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) می‌باشد؛ پس از ۲۴ ساعت برای گزینش سلول‌های دریافت کننده‌ی وکتور از محیط کشت کامل استفاده شد. طبق پروتکل تعویض محیط کشت و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک تا گزینش کامل سلول‌ها ادامه یافت.

پس از گذشت چندین روز و مرگ سلول‌های فاقد وکتور حاوی ژن miRNA-143 در اثر آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) و افزایش سلول‌های دریافت کننده‌ی وکتور حاوی ژن miRNA-143 که مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند، سلول‌های موجود در پلیت پس از رسیدن به حد نصاب و پر کردن کامل کف پلیت؛ از پلیت‌ها تریپسینه و جدا گردید و به فلاسک‌های 25ml انتقال داده شد. تعویض محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک طبق پروتکل به مدت ۱۴ روز ادامه یافت.

#### استخراج RNA

بعد از اتمام مرحله ۱۴ روزه‌ی انتقال ژن سلول‌های PC3 با وکتور حاوی ژن miRNA-143 و گزینش سلول‌های دریافت کننده این وکتور توسط آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) و رسیدن سلول‌ها به تعداد مورد نیاز؛ عمل استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده PC3 انجام شد. استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول با نام تجاری Riboex (شرکت Gene All، Lot NO. REX15J12014، کشور کره) انجام گرفت. برای فرآیند استخراج RNA پس از تریپسینه کردن و به دست آوردن رسوب سلولی مطابق دستورالعمل به هر کدام به‌اندازه 1ml محلول RiboEx (شرکت Gene All، Lot NO. REX15J12014، کشور کره) که یک محلول استخراج کننده RNA است اضافه شد، سپس با استفاده از کلروفرم ۳ لایه ایجاد شد که لایه شفاف بالایی حاوی RNA سلول‌ها است، که با سمپلر و با دقت جدا شده و با ایزوپروپانول RNA رسوب داده شد. در ادامه با ۱ میلی لیتر الکل ۷۵٪ شستشو

سلول‌ها با  $\text{PBS}^3$  شستشو داده شدند. تصاویر مهاجرت سلول‌ها به خراش ایجاد شده در زمان ۰، ۶ ساعت، ۱۲ ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۹۶ ساعت با میکروسکوپ معکوس (شرکت Optika مدل XDS\_3 کشور ایتالیا) عکس برداری گردید.

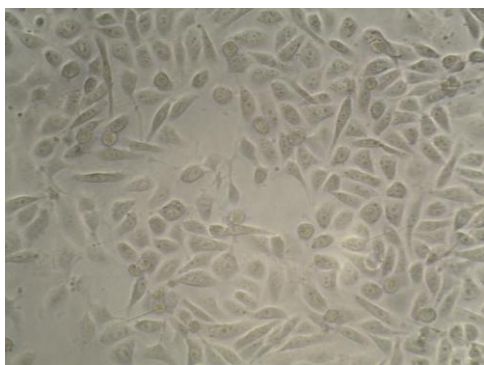
#### آنالیز آماری

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 بین گروه‌های کنترل و تراریخت شده با میکرو RNA (آنالیز واریانس یکطرفه) One-way t test، ANOVA و Two-way ANOVA انجام پذیرفت. 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، وچندین سری پاساژ 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  $\text{IC}_{50}$  آنتی‌بیوتیک Geneticin (G418) تست MTT انجام گرفت. سلول‌ها با

شد، سپس به هر یک از میکروتیوب‌ها مقدار  $5\mu\text{l}$  Master شامل dNTP Green و SYBR (شرکت EXIQON با Lot No. 203421 کشور دانمارک) اضافه شده و همچنین  $1\mu\text{l}$  پرایمر-hsa-miRNA-143 Primer mix (شرکت EXIQON با ID:204483 کشور دانمارک) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به دستگاه Light Cycle 96 (شرکت Roche با REF:05815916001 J و SN:11769) کشور آلمان) انتقال داده شد و برنامه آن را طبق پروتکل به صورت ۱۰ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و 2step به صورت ۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد طی ۴۵ سیکل و در پایان سیکل مرحله ذوب<sup>۱</sup> تنظیم گردید. در این روش کمی میزان بیان نسخه‌های miRNA-143 بر اساس میزان فلورسانس تولید شده در طول تکثیر cDNA اندازه‌گیری می‌شود. در اینجا از رنگ اینتر کاله شونده با DNA دورشته‌ای به نام 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 با Lot No. 177600 کشور دانمارک) به عنوان ژن کنترل داخلی<sup>۲</sup> در کنترل بررسی بیان ژن میکرو RNA پس از انتقال استفاده شد. در پایان داده‌ها با مقایسه مقادیر CT آنالیز شد.

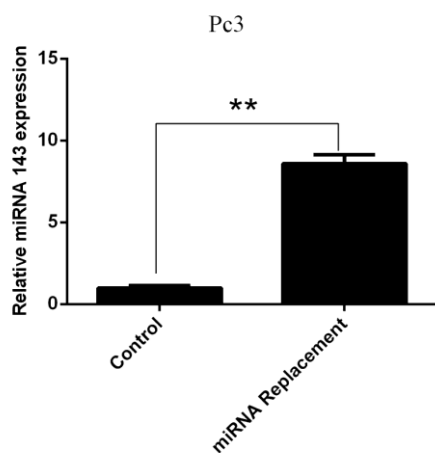
#### تست Wound Healing

در این مرحله یک روز قبل از خراش، رده سلولی PC-3 که شامل سلول‌های کنترل و Vec+ بودند را به طور جداگانه ترپسینه کرده و در یک پلیت ۶ خانه‌ای به صورت یکنواخت و به اندازه  $5 \times 10^5$  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

<sup>3</sup> Phosphate-Buffered Saline

<sup>1</sup> Melting

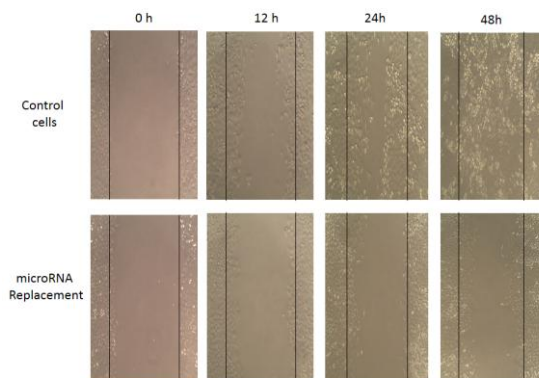
<sup>2</sup> Housekeeping



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

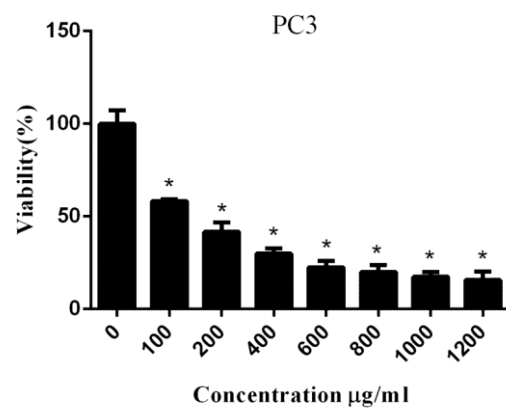
### نتایج تست بهبود خراش<sup>۱</sup>

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 ساعات 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.

دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰  $\mu\text{g/ml}$  تیمار گردیدند و  $IC_{50}$  به دست آمده برای سلول‌های PC3 برابر  $141.9 \mu\text{g/ml}$  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 Geneticin (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 ۲).

<sup>1</sup> Wound Healing Assay



## 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 بیماران که با سرطان پروستات می‌میرند مشخص شده است [۱۷، ۱۸]. میکروRNAها نقش بسیار مهمی در متاستاز سرطان بازی می‌کنند. میکروRNAها مولکول‌های RNA کوچک ۲۵-۲۱ نوکلئوتیدی هستند که با اتصال به میکروRNA هدف در تنظیم بیان ژن نقش اساسی دارند. مشاهدات نشان داد که بیان میکروRNAها در بافت‌های نرمال در مقایسه با 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 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

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 میکروRNA<sup>۱</sup> در سال‌های اخیر مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این روش با جایگزینی میکروRNA در سلول‌های سرطانی از طریق انتقال ژن میکروRNA مورد نظر توسط وکتور، می‌توان بیان میکروRNA را در سلول‌های سرطانی القاء کرد [۱۳].

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

روش درمانی که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت تکنیک درمان با جایگزینی میکروRNA است که در این تکنیک بیان میکروRNAی تومورسپرسور ۱۴۳ در سلول‌های سرطانی پروستات القاء می‌شود. در این مطالعه پس از جایگزینی miRNA-143، آنچه که با دستگاه imaging reader نشان داده شد، حاکی از 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 Geneticin (G-418) می‌باشد، محققین در کشت سلولی با توجه به IC<sub>50</sub> 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 اکثراً از بین رفته و حذف شدند.

<sup>1</sup> microRNA Replacement Therapy

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 کریشر<sup>۱</sup> 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 C4-2, LNCap 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<sup>۲</sup> 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

<sup>1</sup> Kerscher

<sup>2</sup> Qingping

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 پروستات (PC3) از طریق انتقال ژن miRNA-143 توسط وکتور، بیان این میکرو RNA 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.

### References

- 1-Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics, 3<sup>th</sup> 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, Henriquet 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, Ostensfeld 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, Saggiaro 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- $\alpha$  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.