مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و ششم، شماره یک، فروردین ۱۳۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱

جذب سلولی miRNA-101 و ارزیابی تأثیر آن بر القای سمیت سلولی و بیان یوبی کوئیتین لیگاز HECTH9 در سلول های لوسمی میلوئیدی حاد (AML)

نرگس نیکونهاد لطف آبادی[۱]، هما محسنی کوچصفهانی*[۲]، محمدحسن شیخها[۳]، سید مهدی کلانتر[۴]

مقاله پژوهشی

مقدمه: در پژوهش حاضر از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان لیپوزوم کاتیونی جهت ترانسفکشن miR-101 به منظور بررسی سمیت سلولی آن و تاثیرش بر بیان یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* در سلولهای لوسمی میلوئیدی حاد (AML) استفاده شد.

روش بررسی: برای انجام این مطالعه با استفاده از لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان نانو حامل، miR-101 به درون سلول های KG-1 (سلول های میلوئیدی) و HBMF-SPH (سلولهای مغز استخوان سالم) انتقال یافت. سپس با استفاده از تست MTT سمیت سلولی ۴۸ ساعته در هر دو رده سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس اثر این miRNA بر میزان بیان ژن HECTH9 (یوبی کوئیتین لیگاز E3) با استفاده از تکنیک qRT-PCR ارزیابی گردید.

نتایج: یافته‌های این مطالعه نشان دادند که لیپوفکتامین به تنهایی برای هیچ یک از رده‌های سلولی سمیت نداشت اما لیپوفکتامین حامل miR-101 (Lipo/miR-101) در سلول های KG-1 بیشترین سمیت را نسبت به سایر تیمارها ایجاد کردند. نتایج حاصل از انجام تست qRT-PCR نشان داد که تیمار Lipo/miR-101 در سلول های KG-1 سبب بیشترین افزایش بیان در ژن *HECTH9* در سطح mRNA شد.

نتیجه‌گیری: لیپوفکتامین به عنوان یک لیپوزوم کاتیونی می‌تواند به طور موثری ترانسفکشن miR-101 را به درون سلول ها انجام دهد و می‌تواند سبب شود که miR-101 به طور بارزی اثرات ضد توموری خود را با افزایش بیان *HECTH9* و تنظیم واسطه‌های مسیر آپوپتوز میتوکندریایی اعمال نماید. بنابراین miR-101 می‌تواند به عنوان یک مهار کننده تومور توانمند و یک عامل درمانی موثر جهت ژن درمانی در مبتلایان به AML مورد استفاده واقع شود.

واژه‌های کلیدی: لیپوفکتامین ۲۰۰۰، miR-101، *HECTH9*، ژن درمانی، AML

ارجاع: نیکونهاد لطف‌آبادی نرگس، محسنی کوچصفهانی هما، شیخها محمدحسن ، کلانتر سید مهدی. **جذب سلولی miRNA-101 و ارزیابی تأثیر آن بر القای سمیت سلولی و بیان یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* در سلول های لوسمی میلوئیدی حاد (AML)** مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱): ۶۴-۷۶.

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد، ایران
۲- دانشیارگروه سلولی تکوینی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران ،ایران
۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران
۴- گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران
*(نویسنده مسئول)؛تلفن:۰۹۱۲۳۸۴۴۸۷۴ ، پست الکترونیکی: kouchesfehani@yahoo.com کد پستی:۱۵۷۱۹-۱۴۹۱۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد Acute Myeloid Leukemia (AML) یک بیماری بدخیم است که منجر به آنمی، نوتروپنی و ترومبوسیتوپنی می‌شود. این بیماری سرطان نسبتا نادری است که در افراد بالای ۶۰ سال ظاهر می‌شود. شیوع آن در میان افراد جوانتر حدود ۲٪ در بین ۱۰۰۰۰۰ بیمار است. در سنین بین ۸۰-۷۰ سال، تعداد به ۱۵-۱۳ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر افزایش می‌یابد که نشان دهنده این است که میزان ابتلا و شیوع با افزایش سن افزوده می‌شود (۱,۲). AML یک تومور بدخیم سلول های بنیادی خون بند ناف از گروه غیرلنفوئیدی و یک اختلال ژنتیکی کلونال و ناهمگن است که با تجمع تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شود. این تغییرات، مکانیسم‌های طبیعی بازسازی، تکثیر و تمایز را تغییر می‌دهند (۲,۳). به عبارت دیگر، AML گروهی از بدخیمی‌های خونساز است که با تأخیر در رشد و بلوغ سلول های میلوئیدی در مغز استخوان و خون تشخیص داده می‌شود (۴).

در حال حاضر، شیمي‌درمانی با استفاده از داروهای شیمی درمانی مختلفی از خانواده آنتروسایکلین‌ها و به صورت ترکیبی تنها درمان برای درمان AML در بیماران جوان است. این در حالی است که برای بیماران با سن بالای ۶۰ سال، شیمی درمانی ترکیبی امکان پذیر نیست. از این رو تمایل زیادی به استفاده از روش‌های درمانی جدید وجود دارد (۱). امروزه در سراسر جهان برای دستیابی به فن آوری‌های نوین درمانی تلاش‌های زیادی انجام می‌گیرد تا بر کمبودهای ذاتی متدهای شیمی درمانی فائق آمده و بدون آسیب رساندن به سلولهای طبیعی با سرطان مبارزه شود (۵).

ژن درمانی یک روش درمانی جدید است که به دلیل تأثیرات عمده‌ای که می‌گذارد به طور بالقوه قادر به کاهش بیان ژن یا پروتئین است (۶). این روش در بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان و بیماری های قلبی عروقی به کار برده شده است. در بین روشهای درمانی این روش احتمالا از طریق ورود عوامل ژنتیکی به درون سلول های خاصی از بدن بیمار می‌باشد، جایی که پروتئین های کدشده تولید می‌شوند (۷). ژن درمانی شامل ترانسفکشن اجزایی از اسیدهای نوکلئیک نظیر پلاسمیدها، اولیگو نوکلئوتیدهای مختلفی از جمله انواع متفاوتی RNA می‌باشد که به درون هسته یا سیتوپلاسم منتقل شده و به طور موثری قادر به کاهش بیان ژنی که در بیماری دخیل است در هر دو شرایط in vitro و in vivo می‌باشند (۶).

امروزه در میان RNAi های کاندیدای درمان، میکرو RNA هاmicroRNAs (miRNA) به شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند. انتقال miRNA سنتتیک به سلول ها به عنوان ساختارهایی که می‌توانند عملکرد miRNA های داخلی را تقلید کنند روش امیدوار کننده‌ای را برای درمان سرطان ایجاد کرده است. miRNA فرآیندهای سلولی متعددی را هدف قرار داده و بنابراین نسبت به سایر روش های مدرن اثرات گسترده‌تری بر جای می‌گذارند (۸).

miRNA ها گروهی از RNAهای غیر کدکننده کوچک هستند که دارای ۲۲-۱۸ نوکلئوتید بوده و در میان گیاهان و جانوران گسترده‌اند. مطالعات متعددی اهمیت این ساختارها را در حفظ هموستازی سلولی نشان داده‌اند (۹). محققین نقش miRNA ها را در گستره وسیعی از فرآیندهای بیولوژیک نظیر سرطان‌زایی اثبات کرده و نشان داده‌اند که به عنوان کنترل کننده‌های کلیدی در بیان ژن فعالیت می‌کنند. مطالعات نشان داده‌اند که بیان miRNA در سلولهای سرطانی بسیار نامنظم است (۱۰,۱۱). در واقع miRNA ها RNAهای عملکردی هستند که سبب خاموشی بیان ژن از طریق هدف قرار دادن mRNA می‌شود. miRNA ها می‌توانند به عنوان بیومارکرهای تشخیصی، عوامل انکوژنیک یا مهارکننده‌های تومور باشند. این ترکیبات عموما به مراحل مختلف پیشرفت تومور نظیر تکثیر، تهاجم و متاستاز، رگ‌زایی، آپوپتوز و مقاومت به دارو/ پرتو ارتباط می‌یابند (۱۱). بنابراین کاربرد آنها به عنوان یک عامل درمانی به تنهایی یا در ترکیب با داروهای معمول می‌تواند مزایای تکنیکی زیادی را نسبت به سایر روش ها سبب شود. به این جهت که miRNAها مولکول های کوچکی بوده و در مقایسه با پپتیدها و پروتئین ها کمتر آنتی ژنیک می‌باشند، بنابراین می‌توانند نسبت به سایر مولکول های زیستی بهتر عمل کنند (۱۲).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

miR-101 یک مهارکننده تومور است که پیشرفت و توسعه تومور را با کاهش یا مهار بیان برخی از انکوژن ها موجب می‌شود. اثبات شده است که miR-101 می‌تواند تشکیل کلونال تومور را در شرایط in vitro متوقف کرده و از رشد آن در شرایط in vivo ممانعت کند. این miRNA همچنین قادر است که برخی از انواع سلول های سرطانی را نسبت به آپوپتوز حساس نماید. مشخص شده است که Mcl-1 یکی از اهداف عملکردی miR-101 می‌باشد. کاهش بیان miR-101 در انواعی از سرطان‌ها مشاهده شده است (۱۳،۱۴).

یوبی‌کوئی‌تیلاسیون یک تعدیل Modification شایع پروتئین است که سبب نتایجی نظیر اندوسیتوز، دسته‌بندی و عبور و مرور پروتئین ها از خلال غشاء می‌شود. به دلیل اینکه یوبی‌کوئی‌تیلاسیون سرنوشت پروتئین را تعیین می‌کند، یک مکانیسم کلیدی برای کنترل سیگنالینگ بیولوژیک در بسیاری از اجزای سلولی است. یوبی‌کوئی‌تیلاسیون پروتئین های بد تا خورده یا آسیب دیده را برای تجزیه به پروتئازوم S۲۶ هدایت می‌کند، اما یوبی‌کوئی‌تیلاسیون هم چنین می‌تواند سیگنالینگ را با تنظیم سطوح سلولی پروتئین ها و با کنترل جایابی تحت سلولی آنها، کنترل کند. فرآیند یوبی‌کوئی‌تیلاسیون شامل انتقال پی‌درپی یوبی‌کوئی‌تین فعال شده، یک پروتئین ۷۶ اسیدآمینه‌ای، مابین یک آنزیم فعال کننده یوبی‌کوئی‌تین (E1)، یک آنزیم کونژوگه کننده یوبی‌کوئی‌تین (E2) و یک لیگاز پروتئین یوبی‌کوئی‌تین (E3) می‌باشد. E3 انتقال یوبی‌کوئی‌تین را به یک یا تعداد بیشتری از باقی‌مانده لیزین در سوبسترا تسهیل می‌کند. یک موجود زنده به طور نرمال حاوی تعداد کمی E1 و E2 بوده اما تعداد زیادی E3 دارد. تخمین زده شده که ژنوم انسان ۲ تا E1، تقریبا ۳۰ تا E2 و بیش از ۶۰۰ تا E3 دارد. معمولاً دو نوع E3 یافت می‌شود: نوع RING و نوع HECT (۱۵).

یوبی‌کوئیتین لیگاز *HECTH9* (E3)، یک پروتئین بزرگ حاوی ۴۳۷۴ باقی‌مانده اسیدآمینه است و علاوه بر دومین HECT، حاوی یک دومین WWE و یک دومین BH3 است. برخی از سوبستراهای بالقوه برای *HECTH9* تعیین شده‌اند که شامل P53، هیستون ها، پروتئین آنتی آپوپتوتیک Mcl-1، پروتو انکوپروتئین‌های C-Myc و N-Myc و پروتئین تنظیم کننده همانندسازی DNAی Cdc6 می‌باشند. در مجموع اطلاعات نشان می‌دهند که *HECTH9* خصوصیات تکثیری و ضدتکثیری دارد و اثر احتمالی فعال‌سازی یا عدم فعال‌سازی *HECTH9* احتمالاً بستگی دارد به بافت مربوطه و یا وقایع اضافی که عملکرد *HECTH9* را تحت تأثیر قرار می‌دهند. البته شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهد *HECTH9* دارای خصوصیات پروآپوپتوتیک می‌باشد (۱۶).

نتایج مطالعات مختلف تأئید کرده‌اند که miR-101 یک مهار کننده تومور می‌باشد که یکی از اهداف آن ژن Mcl-1 است و از سوی دیگر پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Mcl-1 سوبسترای *HECTH9* نیز می‌باشد. لذا با توجه به اهمیت miRNA به عنوان یک عامل درمانی در فرآیند ژن درمانی در سرطان‌های مختلف و با نظر به اشتراکات موجود در ژن‌های هدف ذکر شده در بالا، هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر miR-101 بر بیان یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* در سطح mRNA در رده‌های سلولی KG-1 (سلولهای AML) و HBMF-SPH (سلول های طبیعی مغز استخوان) بود.

روش بررسی

مواد شیمیایی و سلول‌ها

پنی‌سیلین، استرپتومایسین، 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)، بافر HEPES و has-miR-101 از شرکت سیگما (St. Louis, MO, USA) خریداری شدند. محیط کشت RPMI 1640، بافر PBS Phosphate buffered saline و FBS Fetal Bovine Serum از شرکت Gibco (USA) خریداری شدند. کیت استخراج RNA (RNeasy Mini Kit) از شرکت Qiagen (USA) و کیت سنتز cDNA (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) از شرکت Thermo Scientific (USA) خریداری شدند. آنتی‌بادی های اولیه از شرکت Santa Cruz Biotechnology (USA) تهیه گردیدند. آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP و لیپوفکتامین Lipofectamine 2000 از شرکت Invitrogen

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

(USA) خریداری شدند. رده‌های سلولی مورد مطالعه شامل سلول مغز استخوان انسانی، رده HBMF-SPH و KG-1 (سلول های AML) از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند. از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر، اتانول مطلق و آب دیونیزه استفاده گردید. تمامی مواد شیمیایی دیگر و حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید آنالیتیکال Analytic grade بوده‌اند.

تهیه لیپوزوم های کاتیونی بارگذاری شده با miR-101 و انتقال به سلول

برای انتقال miR-101 به سلول ها نیاز به یک نانو حامل بود که در این مطالعه از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipo) که یک لیپوزوم کاتیونی تجاری است، استفاده گردید. به منظور بارگذاری miR-101 از لیپوفکتامین مطابق با پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید به طوری‌که غلظت نهایی Lipo/ miR-101 برای ترانسفکشن به درون سلولهای مورد نظر به ۲۵ نانو مولار برسد.

کشت سلول

سلول‌های مورد مطالعه شامل سلول‌های KG-1، یک رده از سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد (AML) و سلولهای HBMF-SPH، یک رده از سلول‌های سالم مغز استخوان بود. این سلول‌ها در فلاسک ۲۵ cm^2 و در محیط کشت RPMI 1640 که حاوی ۱۰ ٪ سرم، ۵۰ mg استرپتومایسین و پنی‌سیلین در هر میلی‌لیتر دردمای ۳۷ °C با ۵ ٪ CO2 و رطوبت ۹۵ ٪ کشت داده شدند. در این تحقیق هر دو سلول پس از سه دوره پاساژ موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی جذب سلولی Cellular uptake

سلول‌های KG-1 و HBMF-SPH با تراکم $۱۰^۵ \times ۵$ سلول در هر چاهک از پلیت ۶ چاهکی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها برای ارزیابی جذب miR-101 در معرض تیمارهایی از Fam labled miR، Lipo/ Fam labled miR قرار داده شدند. پس از تیمار، سلول‌ها برای ۳ ساعت انکوبه شده، ۳ مرتبه با PBS شسته شده و با محلول ۴ ٪ پارافرمالدئید (Thermo Scientific, USA) فیکس شدند. محلول 4',6-diamidino-2-phenylindole (۰/۱۲۵ µg/ml، DAPI) برای رنگ‌آمیزی هسته‌های سلول‌های زنده KG-1 و HBMF-SPH استفاده گردید. برای این منظور سلول‌های فیکس شده برای مدت ۱۵ دقیقه با DAPI تیمار شده و جذب سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

ارزیابی سمیت سلولی cytotoxocity لیپوزومهای کاتیونی حاوی miRNA در رده‌های سلولی مغز استخوان

اثرات سیتوتوکسیک miR-101 و Lipo/ miR-101 روی سلولهای HBMF-SPH و KG-1 با استفاده از تست MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ارزیابی شد. این تست یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود.

این سنجش در دوره‌های زمانی۴۸ و ۷۲ ساعت و با هر دو رده سلولی انجام پذیرفت. سلول‌ها به تعداد $۱۰^۴$ سلول در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه حاوی محیط کشت، کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌های کشت داده شده در معرض تیمارهایی از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipo)، miR-101 و Lipo/ miR-101 قرار گرفتند. آزمایش MTT ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون انجام شد. برای انجام این تست، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و بعد از ۳ ساعت انکوباسیون محلول درون چاهک‌ها به طور کامل دور ریخته شد و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزا ریدر اندازه‌گیری گردید. سپس، میزان درصد بقا با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بقای سلولی} = ۱۰۰ \times \frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت–میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت–میانگین جذب نوری در گروه کنترل}}$$

به این ترتیب درصد بقای سلولی حاصل از فرمولاسیونهای متفاوت لیپوزوم‌های کاتیونی تعیین و مقایسه شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

ترانسفکشن سلولی

سلول‌های HBMF-SPH و KG-1 با تراکم ۱×۱۰^{۶} در هر چاهک از پلیت ۶ چاهکی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مناسب انکوبه شدند. پس از این مدت، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض تیمارهایی از Lipo/miR-101 و miR-101 با غلظت نهایی ۲۵ µm قرار داده شده و سپس ارزیابی‌های بعدی روی این سلول‌های تیمار شده انجام گرفت.

Real time-PCR (qRT-PCR) کمی

آنالیز RT-PCR کمی به منظور تعیین سطح بیان نسبی ژن یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* به کار برده شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار، RNA تام از سلولهای تیمار شده با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. پس از تیمار با DNase به منظور برطرف نمودن آلودگی ژنومیک، کیفیت و غلظت RNA با استفاده از نانودراپ (Waltham, MA, USA) بررسی گردید. سپس مجموعا مقدار ۱ میلی گرم RNA برای سنتز cDNAcomplementary DNA تک رشته‌ای مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنتز cDNA از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. به منظور ارزیابی بیان ژن *HECTH9* از تکنیک qRT-PCR با استفاده از مستر میکس SYBRR Green Master mix استفاده گردید. در این آزمایش از ژن گلیسر آلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. این تست برای هر نمونه ۳ مرتبه تکرار شد. جدول ۱ پرایمرهای مربوط به هر دو ژن را نشان می‌دهد

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه برای تکثیر ژن هدف *(HECTH9)* و ژن مرجع (GAPDH).

نام	سکانس	طول محصول
F-۹HECTH	'۳-AGTAGTCAATCAGGTGTGGGAAG-'۵	۱۸۹
R-۹HECTH	'۳ -TCAACCACCCAAGCACAAGG – '۵	
F-GAPDH	'۳-TGCACCACCAACTGCTTAGC-'۵	۸۷
R-GAPDH	'۳-GGCATGGACTGTGGTCATGAG -'۵	

داده‌ها، بر اساس CT های به دست آمده، با ژن مرجع نرمالایز شده و با توجه به اینکه راندمان PCR بالاتر از ۹۰٪ بود، با استفاده از روش ($۲^{-\Delta\Delta Ct}$) میزان بیان ژن *HECTH9* ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی آماری نتایج از نرم افزار SPSS (ver. 22) استفاده گردید. جهت آنالیزآماری نتایج از تست‌های آماری ANOVA و Student's T-test استفاده گردید و معناداری نتایج بر حسب P-value <۰/۰۵ سنجیده شد.

ملاحظات اخلاقی در این تحقیق ملاحظات اخلاقی مورد تایید معاونت پژوهشی دانشگاه علم و هنر یزد قرارگرفته است .

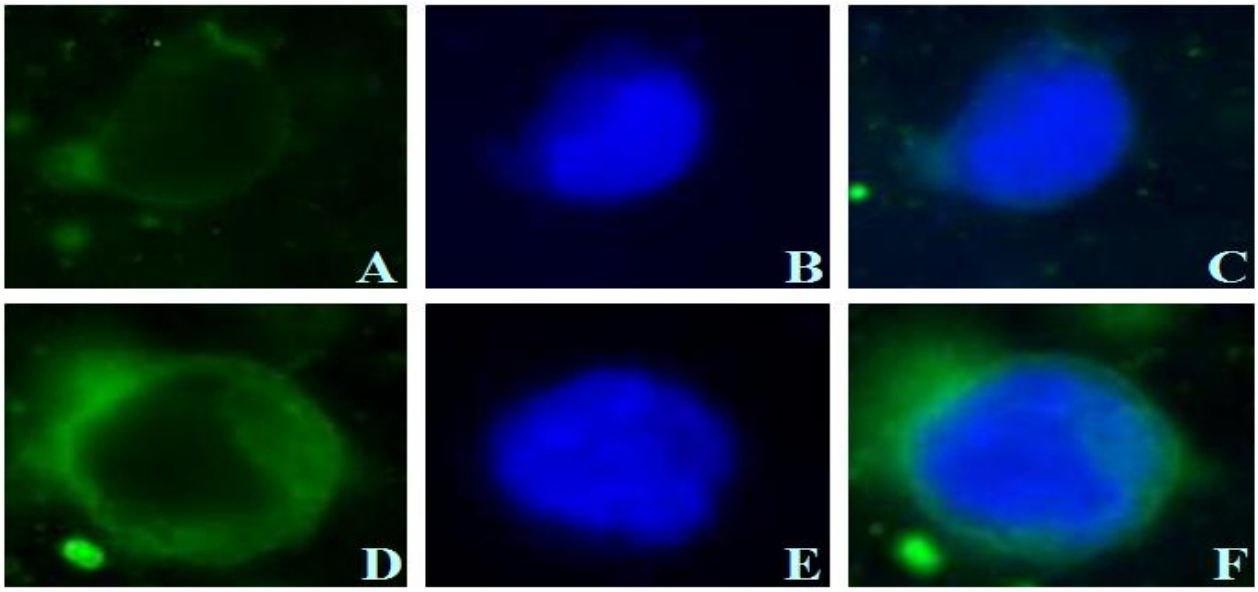
نتایج

بررسی جذب سلولی

به منظور ارزیابی توانایی انتقال miRNA توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون سلول‌ها، سلول‌های KG-1 و HBMF-SPH در معرض تیمارهایی از Lipo/Fam-labled miRNA و Fam-labled miRNA قرار گرفته و پس از ۳ ساعت انکوباسیون، جذب درون سلولی توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد (شکل ۱). نتایج حاصله نشان می‌دهند که شدت فلورسنس در سلول‌هایی که با Fam-labled miRNA تنها تیمار شده‌اند بسیار ناچیز است که می‌تواند نشان دهنده ترانسفکشن جزئی Fam-labled miRNA به درون سلول‌های KG-1 و HBMF-

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

SPH باشد. این در حالی است که سلول‌هایی که با Lipo/Fam-labled miRNA تیمار شده‌اند، شدت فلورسنس بسیار بیشتری را نشان می‌دهد. هم‌چنان‌که در شکل ۱ مشاهده می‌شود لیپوفکتامین ۲۰۰۰ می‌تواند miRNA را به صورت بسیار موثرتری به درون سلولها انتقال دهد. نتایج نشان می‌دهند که نانوحاملهای مبتنی بر لیپید نظیر لیپوفکتامین می‌توانند برای رسانش فعالانه انواع اسیدهای نوکلئیک به سلول‌ها مورد استفاده واقع شده و می‌توانند یک سیستم بالقوه رسانش ژن در درمان سرطان باشند .

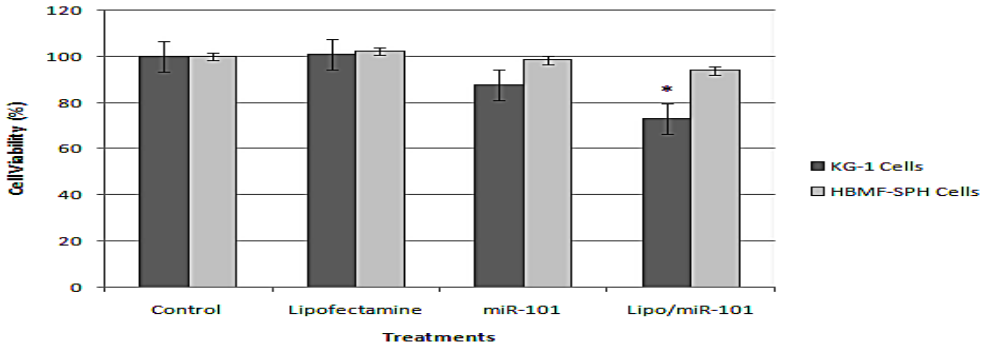


شکل ۱. A) جذب درون سلولی Lipo/Fam-labled miRNA (سبز) در سلولهای KG-1 که با میکروسکوپ فلورسنت پس از ۳ ساعت انکوباسیون مشاهده گردید. B) هسته سلول KG-1 که قبل از مشاهده با DAPI رنگ آمیزی شده است (آبی). C) تصویر ادغام شده. D) جذب درون سلولی Lipo/Fam-labled miRNA (سبز) در سلولهای HBMF-SPH که با میکروسکوپ فلورسنت پس از ۳ ساعت انکوباسیون مشاهده گردید. E) هسته سلول HBMF-SPH که قبل از مشاهده با DAPI رنگ آمیزی شده است (آبی). F) تصویر ادغام شده.

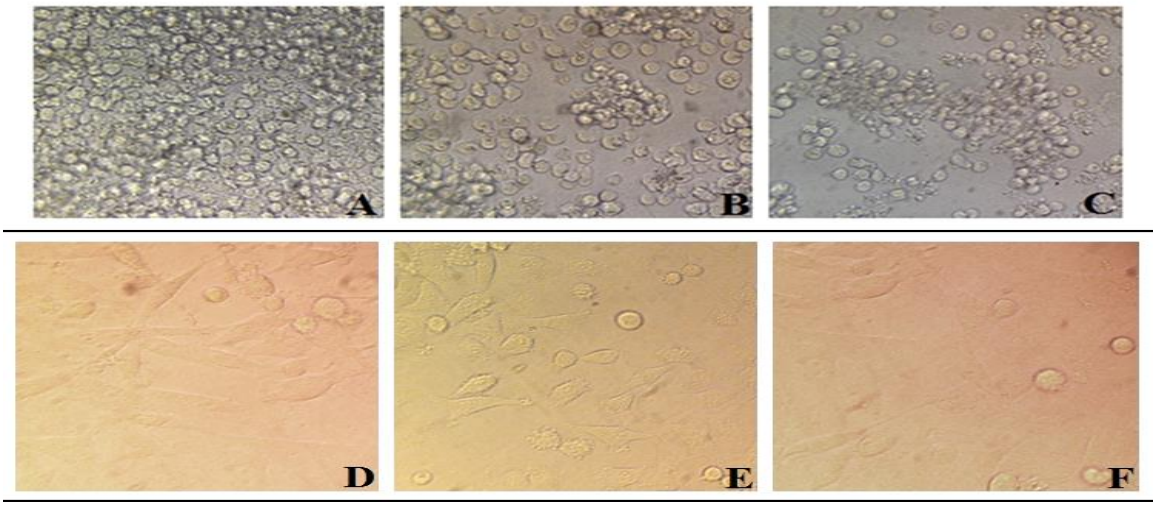
ممانعت از تکثیر سلول های AML با استفاده از miRNA-101

در این بخش از مطالعه، برای بررسی سمیت سلولی از تست MTT استفاده گردید. در ابتدا به منظور اطمینان از عدم سمیت لیپوفکتامین ۲۰۰۰ برای سلول‌ها، هر دو رده سلولی KG-1 و HBMF-SPH با لیپوفکتامین تیمار شدند. پس از مشاهده عدم سمیت لیپوفکتامین، سمیت سلولی miR-101 در هر دو رده سلولی انجام گرفت. همچنان‌که در شکل ۲ نشان داده شده است لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان یک حامل مبتنی بر لیپید کاتیونی هیچگونه اثر سمی بر سلولها ندارد. سمیت سلولی مشاهده شده در سلولهای KG-1 که در معرض Lipo/miR-101 و miR-101 قرار داده شدند به طور معنی‌داری پس از ۴۸ ساعت تیمار بیشتر از سلول های HBMF-SPH بود ($p<۰/۰۵$). به علاوه سلول‌های KG-1 که در Lipo/miR-101 قرار داده شدند به طور معنی‌داری نسبت به تیمار miR-101 برای همین سلول‌ها، سمیت سلولی از خود نشان دادند ($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از MTT نشان دادند که Lipo/miR-101 توانست به طور موفقیت‌آمیزی در مقایسه با miR-101 تنها به درون سلول‌ها وارد شده و اثرات miR-101 را بر سلول اعمال نماید. نتایج همچنین نشان دادند که لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان یک حامل مبتنی بر لیپید کاتیونی می‌تواند به خوبی با شارژ منفی miR-101 واکنش داده و به طور موثری به درون سلولها وارد شود.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۲. میزان بقای سلولهای KG-1 و HBMF-SPH پس از ۴۸ ساعت تیمار با لیپوفکتامین، miR-101 و Lipo/miR-101. بقا به طور معنی‌داری در سلولهای KG-1 تیمار شده با Lipo/miR-101 در مقایسه با سایر گروهها کاسته شده است. (سطح معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شده است.)



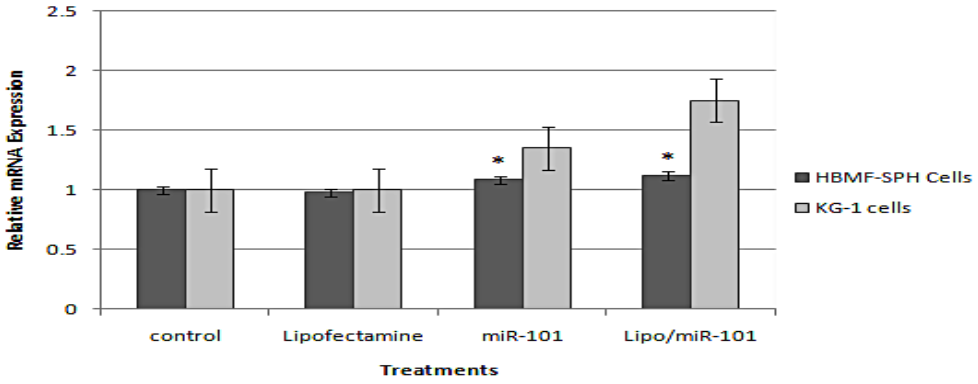
شکل ۳. بقای سلولهای KG-1 (A-C) و سلولهای HBMF-SPH (D-F) پس از ۴۸ ساعت قرار داشتن در معرض تیمارهای مختلف. (A) و (D) سلول های تیمار شده با لیپوفکتامین ۲۰۰۰. (B) و (E) سلول های تیمارشده با miR-101 تنها. (C) و (F) سلول های تیمار شده با Lipo/miR-101. نتایج نشان می دهند که درصد بقای سلولهای KG-1 در دو گروه تیمار miR-101 و Lipo/miR-101 تفاوت معنی‌داری با هم دارند ($p<۰/۰۵$).

افزایش بیان ژن *HECTH9* پس از ترانسفکشن miR-101

به منظور بررسی اثر ترانسفکشن miR-101 بر بیان ژن *HECTH9* از تکنیک qRT-PCR استفاده گردید. همچنان که در شکل ۴ نشان داده شده است سطح بیان *HECTH9* در سلولهای هر دو رده سلولی KG-1 و HBMF-SPH که در معرض تیمارهای miR-101 تنها و Lipo/miR-101 قرار گرفته‌اند، افزایش یافت. البته افزایش بیان این ژن در سلول‌های KG-1 به طور معنی‌داری در مقایسه با سلول‌های HBMF-SPH بیشتر بود ($p<۰/۰۵$) تیمار Lipo/miR-101 در هر دو رده سلولی سبب افزایش بیان بیشتری نسبت به سایر تیمارها شد اما تنها در سلول‌های KG-1، افزایش معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

به‌علاوه در سلول‌های KG-1 سطح بیان ژن *HECTH9* در سلول‌های تیمار شده با Lipo/miR-101 نسبت به سلول‌های تیمار شده با miR-101 تنها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$) بنابراین، نتایج حاصل از تکنیک qRT-PCR نشان دادند که این تیمار می‌تواند بیان ژن *HECTH9* را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد ($p<۰/۰۵$) این یافته‌ها نشان دادند که بیان یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* پس از ترانسفکشن سلول‌ها با لیپوزوم کاتیونی (لیپوفکتامین ۲۰۰۰) حامل miR-101 به صورت قابل توجهی افزایش خواهد یافت.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



شکل ۴. سطح نسبی بیان ژن *HECTH9* در هر دو سلول KG-1 و HBMF-SPH پس از قرار گرفتن در معرض تیمارهای مختلف پس از ۲۴ ساعت تیمار. یافته‌ها نشان می‌دهند که بیان نسبی ژن *HECTH9* پس از ترانسفکشن miR-101 با استفاده از لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (تیمار Lipo/miR-101.) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p<۰/۰۵$).

بحث

در بحث سرطان یکی از موضوعات حائز اهمیت جایگزینی درمان‌های سنتی نظیر شیمی‌درمانی که دارای عوارض جانبی زیادی هستند، با متدهای درمانی جدید و ایمن‌تر می‌باشد (۱۷). پیشرفت‌های اخیر در زمینه درمان سرطان منجر به توسعه روش های جدید درمانی خصوصا ژن درمانی شده است. ژن درمانی شامل هرگونه روشی برای درمان بیماری با استفاده از تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها است. موادی که در فرآیند ژن درمانی مورد استفاده واقع می‌شوند شامل انواع متفاوتی از اسیدهای نوکلئیک نظیر پلاسمید، miRNA و siRNA می‌باشند (۱۸،۱۹).

miRNA یکی از عواملی است که نقش مهمی را در ایجاد سرطان ایفا می‌کند. دخالت این عامل در بروز سرطان یک فرآیند چند مرحله‌ای است. مطالعات متعددی نشان دادند که بیان بیش از حد یا حذف miRNA می‌تواند با ایجاد سرطان‌های مختلف وابسته و مرتبط باشد (۹). در سالهای اخیر بسیاری از نقشهای تنظیمی کشف شده miRNA سبب جذابیت این گروه از اسیدهای نوکلئیک شده است. علاوه بر نقشهای تنظیمی miRNAها در فرآیندهای سلولی، آنها پتانسیل قابل ملاحظه‌ای برای کاربردهای تشخیصی و درمانی نیز دارند (۲۰). یکی از مهمترین چالشها در کاربرد miRNA به عنوان یک عامل درمانی این است که چگونه این عوامل می توانند به سلول‌ها وارد شوند. miRNAها به علت اندازه و باری که دارند به سختی می‌توانند از غشای سلول عبور کنند. بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که حامل‌هایی طراحی و سنتز شوند تا سبب سهولت در فرآیند ژن درمانی شده و ترانسفکشن ژن را به درون سلول‌ها امکان‌پذیر نمایند. لیپوفکتامین ۲۰۰۰ یک حامل لیپیدی تجارتی است که به عنوان یک حامل مبتنی بر لیپید کاتیونی به منظور کاربرد در ژن درمانی تولید شده و مورد استفاده واقع می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده این حامل برای حمل و رسانش miRNA بسیار موثر عمل می‌کند (۲۱). در مطالعه حاضر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به عنوان حاملی جهت رسانش miRNA استفاده شد. نتایج مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت تأئید می‌کند که ورود miRNA به درون سلول با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ نسبت به miRNA تنها موثرتر است (شکل ۱). این یافته‌ها با نتایج Bakhshandeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ و نتایج Huang و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطابقت دارد (۲۱،۲۲).

نتایج تست MTT نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌های KG-1 بطور معنی‌داری در سلول‌هایی که در معرض تیمار Lipo/miR-101 قرار گرفتند در مقایسه با سایر گروه‌ها کاسته شد. این یافته‌ها می‌تواند نشان دهنده نقش مهارکنندگی miR-101 در AML می‌باشد. نتایج این تست تأئید می‌کند که

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

miR-101 اگزوژن به طور معنی‌داری تکثیر سلولی را در AML مهار می‌کند (شکل ۲ و ۳). این نتایج با یافته‌های سایر محققین که نقش مهارکنندگی miR-101 را در سرطان های مختلف نشان داده‌اند مشابه است. Xu و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که ترانسفکشن این miRNA از تکثیر رده های سلولی کارسینومای هپاتوسلولار hepatocellular carcinoma ممانعت می‌کند (۱۴). Bao و همکاران در سال ۲۰۱۶ به نتایج مشابهی در کارسینومای مثانه دست یافتند (۲۳). سایر محققین نتایج مشابهی را در سایر انواع سرطان به دست آوردند (۲۷–۲۴).

HECTH9 یک یوبی کوئیتین لیگاز E3 می‌باشد که نقش مهمی در هماهنگی فرآیندهای سلولی متنوع ایفا می‌کند. مشخص شده که تنظیم این لیگاز در انواع مختلفی از سرطان‌ها به‌هم خورده و عملکردهای آن در ایجاد سرطان هنوز بحث برانگیز باقیمانده است (۲۸). این آنزیم پایداری سوبستراهای سلولی متنوع و در نتیجه فرآیندهای فیزیولوژیک متعددی را شامل همانند سازی و ترمیم DNA، تکثیر و تمایز، و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. جالب توجه است که *HECTH9* دو عملکرد پروانکوژنیک و مهار کنندگی تومور را در مدلهای توموری مختلف از خود نشان داده است. البته این مسئله به گسترده سوبستراهایی که تحت تأثیر قرار می‌دهد، بر می‌گردد. چرا که *HECTH9* می‌تواند انکوپروتئینهایی نظیر C-MYC و N-MYC و MCL-1 و یا مهار کننده‌های توموری نظیر p53 را هدف قرار دهد (۲۹).

در این مطالعه، با استفاده از تکنیک qRT-PCR، سطح بیان *HECTH9* پس از ترانسفکشن miR-101 توسط لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ارزیابی گردید. نتایج این تست نشان دادند که بیان *HECTH9* در سطح mRNA پس از ترانسفکشن miR-101 به درون سلولهای AML افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که miR-101 اگزوژن می‌تواند سبب افزایش بیان یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* شود. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که پروتئین آنتی آپوپتوتیک MCL-1، از خانواده BCL-2، یکی از اهداف یوبی کوئیتین لیگاز *HECTH9* است (۳۲–۲۸). *HECTH9* که یک E3 لیگاز است عامل یوبی کوئیتیناسیون MCL-1 است (۳۱). مطالعات نشان داده‌اند که دومین HECT از E3 لیگاز *HECTH9* پروتئین MCL-1 را برای تجزیه هدف قرار می‌دهد. در تأئید این مطلب مطالعه‌ای نشان داده شده است که سرکوب *HECTH9* توسط siRNA سبب افزایش میزان پروتئین MCL-1 در سلولهای سرطان پستان و ممانعت از آپوپتوز شد. در مقابل افزایش بیان *HECTH9* سبب کاهش مقدار پروتئین MCL-1 و افزایش میزان مرگ سلولی گردید (۳۳). این یافته‌ها با نتایج MA و همکاران در سال ۲۰۱۶ که بیان *HECTH9* را در سلول‌های سرطان تیروئید مطالعه نمودند، مطابقت دارد. آنها گزارش دادند که با سرکوب نمودن بیان *HECTH9* در سه رده از سلول‌های سرطان تیروئید تکثیر سلولی، تهاجم به بافتهای اطراف و متاستاز در این سلول‌ها افزایش یافت. نتایج آنها نشان داد که افزایش بیان *HECTH9* در مدلهای موشی به طور معنی‌داری رشد تومورها را سرکوب نموده و می‌تواند سطح پروتئین p53 را از طریق پایدار ساختن آن تنظیم نماید (۲۸).

از سوی دیگر گزارش شده است که پروتئین آنتی آپوپتوتیک MCL-1 و پروتئین EZH2 اهداف مستقیم miR-101 می‌باشند (۳۴) که این miRNA با هدف قرار دادن آنها سبب افزایش بیان پروتئین پروآپوپتوتیک BIM و در نهایت القاء آپوپتوز در AML می‌شود (۳۵). البته گزارش شده است این گونه عملکردهای miR-101 در سلول های نرمال انجام نمی‌شود (۳۶). بنابراین از یافته‌های مطالعات چنین برمی‌آید که در حضور miR-101 اگزوژن و با افزایش بیان *HECTH9* واسطه‌های مسیر آپوپتوز میتوکندریایی در سلول‌های AML به طریقی تنظیم می‌شوند که بتوانند از تکثیر سلول‌ها جلوگیری کرده و سبب مرگ سلولی شوند.

داده‌های حاصل از این مطالعه تأئید کننده خواص ضد سرطانی miR-101 در سلول‌های AML می‌باشد اما از آنجایی که این نتایج تنها از کاربرد miR-101 در شرایط in vitro به دست آمده است جهت اطمینان از عملکرد این miR در شرایط فیزیولوژیک بدن، بهتر است ارزیابی اثر آن در شرایط in vivo نیز صورت پذیرد. حتی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

در صورتی که به توان اثرات miR-101 را در رده‌های مختلف سلولهای سرطانی بررسی نمود نتایج بیشتر قابل استناد و اطمینان خواهند بود.

نتیجه گیری

با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که miR-101 با هدف قرار دادن ژنهای هدفی نظیر *MCL-1* و *EZH2* و با افزایش بیان یوبی کوئیتین لیگاز HECTH9 که ژنهایی مانند *MCL-1* و *p53* را هدف قرار می‌دهد نقش خود را به عنوان یک عامل سرکوب کننده تومور به خوبی در شرایط in vivo ایفا می‌کند و می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی جدید برای مبتلایان به سرطان لوسمی میلوئیدی حاد (AML) سودمند باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت‌های پردیس بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد انجام گرفته است، بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارند.

تعارض در منافع: مابین نویسندگان این مقاله و شرکتهای دارویی تضاد منافع وجود ندارد.

References:

1- Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. ***Therapeutic advances in acute myeloid leukemia.*** J Clin Oncol 2011; 29(5): 487–94.

2- Altucci L, Clarke N, Nebbioso A, Scognamiglio A, Gronemeyer H. ***Acute myeloid leukemia: therapeutic impact of epigenetic drugs.*** Int J Biochem Cell Biol 2005; 37(9): 1752–62.

3- Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. ***Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications***. J Clin Oncol 2011; 29(5): 475-86

4- Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, Rosa M La, Dagnino L, et al. ***Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia***. Am J Hematol 2010; 85(5): 331–9.

5- del Burgo LS, Hernández RM, Orive G, Pedraz JL. ***Nanotherapeutic approaches for brain cancer management.*** Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med 2014; 10(5): 905–19.

6- Nordling-David MM, Golomb G. ***Gene delivery by liposomes***. Isr J Chem 2013; 53(9–10): 737–47.

7- Jayakumar R, Chennazhi KP, Muzzarelli RAA, Tamura H, Nair SV, Selvamurugan N. ***Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy***. Carbohydr Polym 2010; 79(1): 1–8.

8- Cortez MA, Valdecanas D, Zhang X, Zhan Y, Bhardwaj V, Calin G a, et al. ***Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer***. Mol Ther 2014; 22(8): 1494-1503.

9- Ji W, Sun B, Su C. ***Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy***. Genes 2017; 8(1): 21.

10- Peng Y, Croce CM. ***The role of MicroRNAs in human cancer***. Signal Transduct Target.Ther 2016; 1(15004): 1–9.

11- Wang H, Jiang Y, Peng H, Chen Y, Zhu P, Huang Y. ***Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors***. Adv Drug Deliv Rev 2015; 81: 142–60.

12- Soriano A, Jubierre L, Almazán-Moga A, Molist C, Roma J, de Toledo JS, et al. ***microRNAs as pharmacological targets in cancer.*** Pharmacol Res 2013; 75: 3–14.

13- Su H, Yang J-R, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Y, et al. ***MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity***.Cancer Res 2009; 69(3): 1135–42.

14- Xu L, Beckebaum S, Iacob S, Wu G, Kaiser GM, Radtke A, et al. ***MicroRNA-101 inhibits human hepatocellular carcinoma progression through EZH2 downregulation and increased cytostatic drug sensitivity.*** J Hepatol 2014; 60(3): 590–8.

15- Rotin D, Kumar S. ***Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases***. Nat Rev Mol cell Biol 2009; 10(6): 398–409.

16- Scheffner M, Kumar S. ***Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects.*** Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res 2014; 1843(1): 61–74.

17- Cross D, Burmester JK. ***Gene therapy for cancer treatment: past, present and future***. Clin Med Res 2006; 4(3): 218–27.

18- Amer MH. ***Gene therapy for cancer: present status and future perspective***. Mol Cell Ther 2014; 2: 1-19.

19- Husain SR, Han J, Au P, Shannon K, Puri RK. ***Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval.*** Cancer Gene Ther 2015; 22(12): 554-63.

20- Baumann V, Winkler J. ***miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents***. Future Med Chem 2014; 6(17): 1967–84.

21- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Ghaemi N. ***A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells***. Cytotechnology 2012; 64(5): 523–40.

22- Huang F, Zhao F, Laing L-P, Zhou M, Qu ZL, Cao YZ, et al. ***Optomizing Transfection Efficiency of Cervical Cancer Cells Transfected by Cationic Liposomes LipofectamineTM2000.*** Asian Pac J Cancer Prev Asian Pac J Cancer Prev 2015; 16(17): 7749–54.

23- Bao R-F, Shu Y-J, Hu Y-P, Wang X-A, Zhang F, Liang H-B, et al***. miR-101 targeting ZFX suppresses tumor proliferation and metastasis by regulating the MAPK/Erk and smad pathways in gallbladder carcinoma.*** Oncotarget 2016; 7(16): 22339-54

24- Huang F, Lin C, Shi YH, Kuerban G. ***MicroRNA-101 inhibits cell proliferation, invasion, and promotes apoptosis by regulating cyclooxygenase-2 in hela cervical carcinoma cells***. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(10): 5915–20.

25- Liu N, Zhang L, Wang Z, Cheng Y, Zhang P, Wang X. ***MicroRNA-101 inhibits proliferation , migration and invasion of human glioblastoma by targeting SOX9***. Oncotarget 2017; 8(12): 19244–54.

26- Luo C, Merz PR, Chen Y, Dickes E, Pscherer A, Schadendorf D, et al. ***MiR-101 inhibits melanoma cell invasion and proliferation by targeting MITF and EZH2***. Cancer Lett 2013; 341(2): 240–7.

27- Luo L, Zhang T, Liu H, Lv T, Yuan D, Yao Y, et al. ***MiR-101 and Mcl-1 in non-small-cell lung***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

cancer: Expression profile and clinical significance. Med Oncol 2012; 29(3): 1681–6.

28- Ma W, Zhao P, Zang L, Zhang K, Liao H, Hu Z. ***Tumour suppressive function of HUWE1 in thyroid cancer.*** J Biosci 2016; 41(3): 395–405.

29- Sander B, Xu W, Eilers M, Popov N, Lorenz S. ***A conformational switch regulates the ubiquitin ligase HUWE1***. Elife 2017; 6: 1–32.

30- Fernald K, Kurokawa M. ***Evading apoptosis in cancer***. Trends Cell Biol 2013; 23(12): 620–33.

31- Poulsen EG, Steinhauer C, Lees M, Lauridsen AM, Ellgaard L, Hartmann-Petersen R. ***HUWE1 and TRIP12 Collaborate in Degradation of Ubiquitin-Fusion Proteins and Misframed Ubiquitin***. PLoS One 2012; 7(11): 1–8.

32- Friez MJ, Brooks SS, Stevenson RE, Field M, Basehore MJ, Adès LC, et al. ***HUWE1 mutations in Juberg-Marsidi and Brooks syndromes: the results of an X-chromosome exome sequencing study***. BMJ Open [Internet] 2016; 6(4):e009537.

33- Kurokawa M, Kim J, Geradts J, Matsuura K, Liu L, Ran X, et al. ***A network of substrates of the E3 ubiquitin ligases MDM2 and HUWE1 control apoptosis independently of p53***. Sci Signal 2013; 6(274): ra32.

34- Gui T, Shen K. ***miRNA-101: a potential target for tumor therapy***. Cancer Epidemiol 2012; 36(6): 537–40.

35- Nikoonahad Lotfabadi N, Mohseni Kouchesfahani H, Sheikhha MH, Kalantar SM**.** ***In vitro transfection of anti-tumor miR-101 induces BIM, a pro-apoptotic protein, expression in acute myeloid leukemia (AML).*** EXCLI J 2017; 16: 1257-67.

36- Kim J, Lee D, Kim J, Choi S, Park W, Ha K, et al. ***A miRNA-101-3p / Bim axis as a determinant of serum deprivation-induced endothelial cell apoptosis***. Cell Death Dis 2017; 8(5): 1–11.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 26 | NO 1 | Feb 2018
Received: 6 Nov 2017
Accepted: 1 Jan 2018

MiRNA -101 transfection and its effect on the cytotoxicity induction and expression of ubiquitin ligase HECTH9 in acute myeloid leukemia cells (AML)

Narges Nikoonahad Lotfabadi[1] , Homa Mohsen Kouchesfehani[2*], Mohammad Hassan Sheikhha[3], Seyed Mehdi Kalantar[4]

Original Article

Introdution: In the present study, Lipofactamine 2000 was used as a cationic liposome for miR-101 transfection in order to investigate its cytotoxicity and its effect on the expression of ubiquitin ligase HECTH9 in acute myeloid leukemia cells (AML).

Methods: MiR- 101 was transferred to KG-1 cells (myeloid cells) and HBMF-SPH (healthy bone marrow cells) using lipofectamine 2000 as a nano carrier. Then, using the MTT test, the 48-hour cell toxicity in both cell lines was evaluated. The effect of this miRNA on the expression of HECTH9 gene (ubiquitin Ligaase E3) was evaluated using qRT-PCR technique.

Results: The findings of this study showed that Lipofactamine alone was not toxic to any of the cell lines, but lipofectamine-containing miR-101 (Lipo / miR-101) in KG-1 cells produced the highest toxicity compared to other treatments. The results of qRT-PCR test showed that Lipo / miR-101 treatment in KG-1 cells caused the highest expression in HECTH9 gene at the mRNA level.

Conclusion: Lipofactamine, as a cationic liposome, can effectively transfect miR-101 into the cells and can cause miR-101 to specifically display its antitumor effect by increasing the expression of HECTH9 and regulating pathways of mitochondrial apoptotic pathway. Therefore, miR-101 can be used as a potent tumor suppressor and an effective therapeutic agent for gene therapy in the patients with AML.

Keywords: lipofectamine 2000, miR-101, HECTH9, gene therapy, AML

Citation Nikoonahad Lotfabadi N, Mohseni Kouchesfehani H Sheikhha M H, Kalantar M. **MiRNA-101 transfection and its effect on the cytotoxicity induction and expression of ubiquitin ligase HECTH9 in acute myeloid leukemia cells (AML)** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(1): 64-76.

[1]Biology Department, Faculty of Sciences, Science and Arts University, Yazd, Iran

[2]Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

[3]Biotechnology Research Center, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

[4]Reproductive & Genetic Unit, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoughi University o of Medical Sciences, Yazd, Iran.

***Corresponding author: Tel:** 09123844874, **email: kouchesfehani@yahoo.com**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]