

ارزیابی اثرات miR-143 لیپوزومه بر زیست پذیری سلولی و بیان ژن آنتی آپوپتویک Bcl-2 در سلول های استئوسارکومای انسانی جهت اثر گذاری بر درمان های متاستاتیک

فاطمه بروزگری فیروزآبادی^{*}^۱، شهربانو عربیان^۲، محمد حسن شیخ ها^۳، سید مهدی کلانتر^۴، آمنه جاوید^۵

مقاله پژوهشی

مقدمه: مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر miR-143 بر بیان ژن Bcl-2 در سطح mRNA و همچنین سمیت سلولی در رده سلولی (از رده های استئوسارکوما) و Hum-63 (سلولهای سالم استخوان) انجام گرفت.

روش برسی: در مطالعه تجربی حاضر برای انتقال miR-143 به داخل سلول های سالم و سرطانی استخوان جهت بررسی اثرات آن بر روی بیان ژن Bcl-2 از لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتمین ۲۰۰۰ استفاده شد سپس اثرات miR-143 بر روی سمیت سلولی (۷۲ ساعته) و بیان ژن Bcl-2 به ترتیب به وسیله تست های MTT و پروتکل RealTimePcr سنجیده شد. از نرم افزار SPSS و آزمون های ANOVA و t-test برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آنها استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که سامانه لیپوفکتمین ۲۰۰۰ به تنهایی هیچ سمیتی در هر دو رده سلولی Hum-63 و SaOs-2 نداشت. سلول های سرطانی SaOs-2 نسبت به سلول های Hum-63 حساسیت بیشتری در مقابل miR-143 آزاد و Lipo/miR-143 از خود نشان دادند. بیشترین کاهش در سلول های SaOs-2 بعد از تیمار با Lipo/miR-143 مشاهده شد ($p<0.05$). همچنین مطابق نتایج، ترانسفکشن سلولی miR-143 توسط لیپوفکتمین ۲۰۰۰ در مقایسه با تیمار سلول ها با miR-143 آزاد، باعث کاهش معنی داری در بیان ژن Bcl-2 شد ($p<0.05$).

نتیجه گیری: سامانه لیپیدی لیپوفکتمین ۲۰۰۰ می تواند در جذب سلولی miR-143 موثر واقع شود. miR-143 از طریق هدف قرار دادن مسیرهای سلولی مختلفی از جمله میزان بیان ژن Bcl-2 می تواند در مسیر درمانی سرطان استخوان (استئوسارکوما) موثر واقع شود.

واژه های کلیدی: miR-143، لیپوفکتمین ۲۰۰۰، Bcl-2، استئوسارکوما

ارجاع: بروزگری فیروزآبادی فاطمه، عربیان شهربانو، شیخ ها محمد حسن، کلانتر سید مهدی، جاوید آمنه. ارزیابی اثرات miR-143 لیپوزومه بر زیست پذیری سلولی و بیان ژن آنتی آپوپتویک BCL-2 در سلول های استئوسارکومای انسانی جهت اثر گذاری بر درمان سرطان های متاستاتیک. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد؛ ۱۳۹۷(۶): ۵۲-۵۴.

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده پوشش های نانوساختار، دانشگاه پیام نور، ایران

۳- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

۴- مرکز تحقیقات زیست فناوری، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد، ایران

۵- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم و هنر، یزد

* (نویسنده مسئول): تلفن ۰۹۱۳۱۵۹۹۶۷۴، پست الکترونیکی: barzegary@gmail.com کد پستی: ۸۹۱۵۱۱۶۵۸۴

mRNA ها مکمل قسمتی از یک یا چندین mRNA هستند، این ساختارهای مولکولی در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلولی شرکت نموده و بسیاری از آن ها می توانند به عنوان انکوژن یا مهار کننده توموری عمل کنند. در چند سال گذشته، بررسی mRNAها در سرطان های انسان آشکار کرده است که بسیاری از mRNA ها به عنوان مهار کننده های تومور عمل می کنند^(۶-۱۰).

پروتئین های خانواده *Bcl-2* در غشاء میتوکندری و شبکه آندوپلاسمیک جای گرفته اند. برخی از اعضای این خانواده (*Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS*) در مهارو برخی دیگر (*Bad, Bal*) در القای آپوپتوز نقش دارند. نسبت عوامل القاء کننده و مهار کننده و توازن بین آن ها تعیین کننده مسیر آپوپتوز یا بقای سلول زنده است. *Bcl-2* یک پروتئین از این خانواده است که توسط ژن *Bcl-2* کد می شود و نقش عمدہ ای در جلوگیری از شروع آپوپتوز بعد از تماس سلول های سرطانی با استرس های سیتو توکسیک دارد.

بیان بالای *Bcl-2* مانع آپوپتوز می شود در نتیجه، مهار بیان *Bcl-2* می تواند دواره آپوپتوز را بازسازی کند. در مطالعاتی گزارش شده که پروتئین *Bcl-2* از خانواده *Bcl-2* در تعدادی از سرطان ها افزایش می یابد^(۱۱,۱۲). هم چنین در مطالعاتی مشخص شده که کاهش miR-143 در تعدادی از سرطان ها موجب افزایش بیان *Bcl-2* و کاهش میزان القاء آپوپتوز می گردد^(۸,۱۱). لذا مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات miR-143 بر بیان ژن *Bcl-2* در سطح mRNA و سمیت سلولی در رده های سلولی SaOs-2 (از رده های استئوسارکوما) و سلول های سالم سالم استخوان (Hum-63) انجام گرفت.

روش بررسی

مواد شیمیایی و سلول ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی می باشد. پنی سیلین، استرپتومایسین، تریپسین EDTA، محیط کشت سلولی، لیپوفکتامین Lipofectamine2000 و سرم آلبومین گاوی (FBS) از شرکت Gibco Invitrogen (آلمان)، تهیه شد.

مقدمه

استئوسارکوم یا استئوژنیک سارکوم Osteosarcoma، osteogenicsarcoma سرطان های بد خیم اولیه استخوان است. سرطان استخوان زمانی اتفاق می افتد که سلول های استخوان ساز دچار مشکل شوند. هر ساله در ایالات متحده، این سرطان به شکل تومور استخوانی در بیش از دو هزار نفر تشخیص داده می شود. این سرطان در کودکان و نوجوانان شایع تر است و در افراد بزرگ سال به خصوص هرچه پیترتر می شوند، کمتر دیده می شود. متأسفانه، روش های درمانی فعلی برای استئوسارکوما به ویژه زمانی که بیماری متاستاز می دهد، اغلب به اندازه کافی موثر نیست. این مساله به خاطر، مقاومت دارویی چندگانه شایع از سمیت درمانی در استئوسارکوما و بروز بسیاری از عوارض جانبی مضر هنگام استفاده از دوز افزایش یافته شیمی درمانی است^(۱,۲).

تکیک ژن درمانی می تواند در درمان سرطان موثر باشد. مولکول های RNA تنظیم کننده ژنی، می توانند به درمان تومورهای سرطانی در مراحل اولیه و قبل از انتشار آن ها، کمک نمایند. روش های درمانی جدید مبتنی بر استفاده از microRNA، برای کنترل سرطان است. این روش را می توان در کنار شیمی درمانی استفاده نمود. تنظیم بیان ژن با mRNA به عنوان عامل مهمی در جلوگیری از گسترش سلول های سرطانی شناخته شده است^(۳,۴,۵).

MicroRNAs (miRNA) شامل RNA های غیر کد کننده کوتاه (حدود ۲۱-۲۵ نوکلئوتید) می باشند که معمولاً به عنوان مهار کننده های mRNA های ژن های هدف عمل کرده و این کار را عمدتاً از طریق تأثیر بر ثبات و ترجمه mRNA ها در سطح پس از ترجمه انجام می دهند. به عبارت دیگر می توان گفت این ترکیبات عبارتند از یک سری عناصر تنظیمی پس از رو نویسی که کار اصلی آن ها در تنظیم ژن ها است و در محدوده وسیعی از یوکاریوت ها یافت می شوند.

استریل شده قرار گرفت و سلول‌ها پس از شمارش به تعداد 5×10^5 سلول به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و اطمینان از چسبیدن سلول‌ها به سطح لامل و رسیدن به مورفولوژی مناسب، محیط کشت چاهک‌ها تعویض و سلول‌ها با miRNA-143-FAM-*miRNA-143*-FAM به تنهایی و Lipo/FAM-*miRNA-143* رقیق شده با محیط کشت تیمار و به مدت سه ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. سلول‌ها سه بار با بافر PBS سرد شسته و با محلول پارافرمالدئید DAPI (ThermoScientific, USA) ثابت شدند. محلول DAPI ۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه به منظور رنگ آمیزی هسته سلول‌ها به کار گرفته شد. راندمان ترانسفکشن سلولی miRNA با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, Japan) ارزیابی شد.

بررسی زنده‌مانی سلولی در اثر تماس با miR-143

میزان زنده‌مانی سلول‌ها به وسیله آزمون MTT تعیین شد. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی (Colorimetry) است که بر اساس احیاء و شکسته شدن کریستال‌های زرد 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) می‌شود. MTT توسط سیستم سوکسینات دهید روژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری هاست احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد.

برای انجام تست، رده‌های سلولی سالم و سرطانی استخوان در یک میکروبیلت ۹۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در دمای 37°C و ۵ درصد کربن دی اکسید در انکوباتور مطروب رشد داده شدند. ۲۴ ساعت به سلول‌ها زمان داده شد تا به کف پلیت به چسبند. پس از گذشت این زمان، محیط کشت درون چاهک‌ها با محیط کشت تازه (کنترل) تعویض و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در معرض *miR-143*, (Lipo) ۲۰۰۰ از لیپوفکتمین

۴ و ۶ دیامیدینو-۲-فنیلیندول (DAPI)، محلول پارافرمالدئید ۴ cDNA درصد و دی متیل سولفوکسید (DMSO) و کیت سنتز First Strand cDNA synthesis kit (Waltham, Massachusetts, USA) از موسسه علمی ترموفیشر (Walsham, Massachusetts, USA) تهیه گردید. تیازولیل بلو تترازولیوم بروماید (MTT), قرص has-miR-143, (MTT) (PBS, pH 7.0) بی‌کربنات سدیم و تریپان بلو از شرکت سیگما آلدريج خریداری شد. کیت استخراج RNA (PureLink RNAMiniKit) از شرکت آمبیون (Ambion, Life technologies, USA) تهیه شد. کلروفرم، ایزوپروپانول و سایر ترکیبات شیمیایی از گرید Merck (آمریکا) تهیه شد.

رده‌های سلولی و محیط کشت

رده‌های سلولی مورد مطالعه شامل SaOs-2 (از رده‌های سلولی سرطان استخوان انسان) از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران خریداری شد و رده سلولی Hum-63 (از سلول‌های سالم استخوان) از طرف دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوqi یزد اهدا شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد در فلاسک T25 کشت داده شدند و پس از انجام سه بار پاساز موفقیت آمیز آزمایش‌های مورد نظر روی آن‌ها انجام گرفت.

بارگذاری miR-143 بر روی نانوسامانه لیپوفکتمین ۲۰۰۰ در ابتدا بر اساس پروتکل شرکت سازنده مقدار آب nuclease free مورد نیاز به محتویات داخل میکروتیوب حاوی miR-143 اضافه و غلظت نهایی به ۵۰ nmol رسانده شد. انتقال miR-143 به داخل سلول چهت بررسی اثرات آن بر روی بیان *ژن Bcl-2* و سمیت سلولی با استفاده از لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتمین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA) و طبق پروتکل شرکت سازنده و با غلظت نهایی ۲۵ نانومولار استفاده گردید.

بررسی میزان ورود سلولی

رده‌های سلولی Hum-63 و SaOs-2 برای مطالعه ترانسفکشن استفاده شدند. ابتدا در کف چاهک‌های یک پلیت ۶ خانه لامل

GAPDH(87bp)forward, 5'-
TGCACCACTGCTTAGC-3'and reverse, 5'-
GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
ژن خانه‌دار GAPDH به عنوان کنترل این آزمایش استفاده گردید و سی‌تی‌های به دست آمده به وسیله آن نرمالایز شدند.
تجزیه و تحلیل آماری
برای بررسی آماری نتایج از نرم افزار SPSS(ver 21) استفاده گردید. و آزمون های Student t-test و ANOVA برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آن ها استفاده شد. معنی داری نتایج بر حسب $P-value < 0.05$ سنجیده شد.

ملاحظات اخلاقی

در این تحقیق ملاحظات اخلاقی مورد تایید معاونت پژوهشی پردازی بین الملل دانشگاه علوم پزشکی یزد قرار گرفته است (کد اخلاق REC.1395.5.IR.SSU.MEDICINE).

نتایج

بررسی میزان ورود سلولی miR-143 (Uptake)

به منظور بررسی توانایی انتقال miRNA توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون سلول ها، ترسنفکشن سلولی Hum-63 و SaOs-2 بعد از ۳ ساعت انکوباسیون توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود میزان شدت نور فلورسنت در سلول های سرطانی-2 SaOs-2 در مقایسه با سلول های سالم Hum-63 بیشتر می باشد که نشان دهنده جذب بیشتر Lipo/ Fam-labeledmiR-143 در سلول های SaOs-2 در مقایسه با سلول های Hum-63 است. لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ توانسته است به طور موثری miR-143 را به درون سلول ها وارد کند.

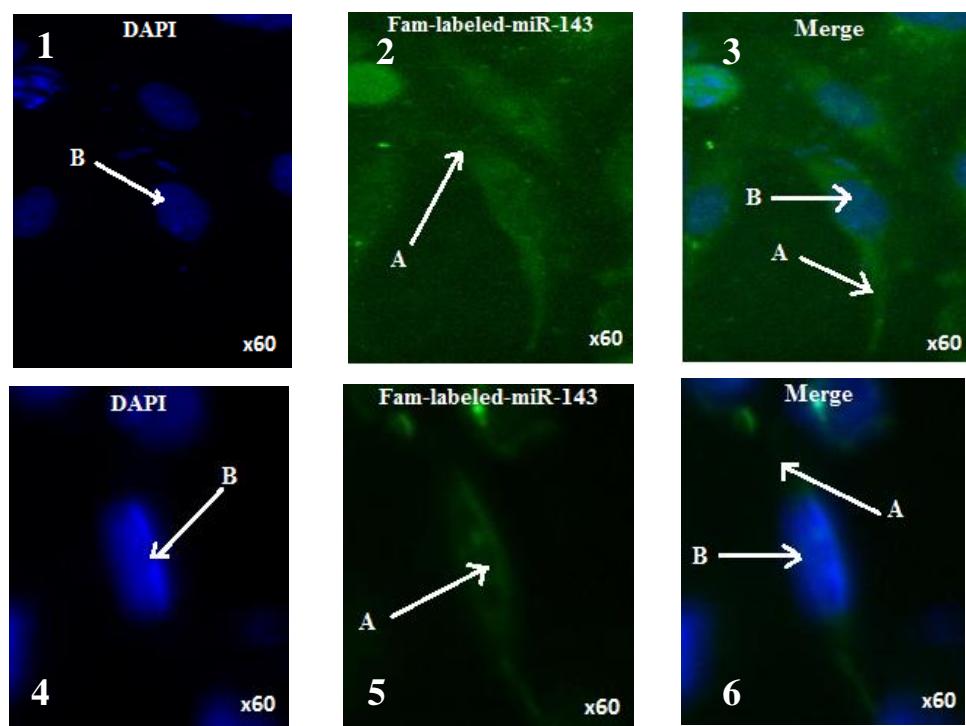
و ۱۴۳ Lipo/miR قرار گرفتند. در تمام این مدت پلیت ها در داخل انکوباتور قرار داشتند، بعد از اتمام این دوره، سلول ها با PBS شسته، و محلول MTT به درون هر چاهک اضافه شد. بعد از اتمام ۴ ساعتی انکوباسیون، محیط داخل چاهک ها به طور کامل حذف و به دنبال آن ۱۸۰ میکرولیتر دی متیل سولفواکسید (DMSO) برای حل کردن کریستال ها اضافه شد. سمیت با توجه به مقدار دانسیته نوری به وسیله میکروپلیت خوان SynergyTMHT (Bioteck Instruments Inc.) اندازه گیری و میزان درصد زنده‌مانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد زنده مانی سلولی} = \frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت}} \times 100$$

بررسی بیان ژن *Bcl-2* در سلول های سالم و سرطانی استخوان میزان بیان ژن *Bcl-2* در رده های سلولی SaOs-2 و Hum-63 با استفاده از تکنیک Real Time-PCR (با سه بار تکرار) سنجیده شد. میزان سطح بیان ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی برای نرمالایز کردن داده های به دست آمده استفاده گردید.

در ابتدا سلول ها در یک میکروپلیت ۶ خانه ای با تراکم 5×10^5 در هر چاهک کشت داده شدند. بعد از آن که سلول ها به مورفولوژی مناسب رسیدند، در معرض تیمارهایی از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ Lipo/miR-143 آزاد و miR-143 (Lipo) قرار گرفتند. سپس RNA تام از سلول های تیمار شده با استفاده از کیت استخراج RNA (PureLink RNAMiniKit) استخراج شد و میزان کیفیت و غلظت RNA استخراج شده با استفاده از نانو دراپ (Waltham, MA, USA) تعیین شد. سنتز cDNA به وسیله RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) انجام گرفت. تولید شده، توسط سکانس پرایمرهای زیر رونویسی گردید:

Bcl-2(452bp)forward, 5'-
GGGAGAACAGGGTACGATAA-3' and reverse, 5'-
CCACCGAACTCAAAGAAGG-3'

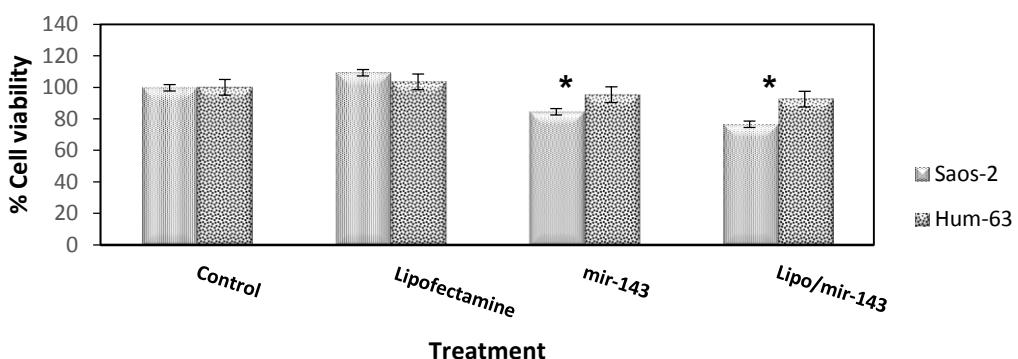


شکل ۱: ترانسفکشن miR-143 (Lipo/ Fam-labeled miR-143) در سلول های SaOs-2 و Hum-63 (A): تجمع miR-143 در سلول های (B): هسته که با DAPI در سیتوپلاسم سلول رنگ آمیزی شده است.

رشد سلولی را کاهش داده اما فرم محصور آن، سمیت بیشتری نشان داده است. سلول های سرطانی SaOs-2 نسبت به سلول های Hum-63 حساسیت بیشتری در مقابل miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143 از خود نشان دادند. این نتایج نشان می دهد سامانه لیپیدی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ می تواند در جذب سلولی miR-143 موثر واقع شود که این تاثیر در سلول های سرطانی استخوان به مراتب بیشتر از سلول های سالم است.

بررسی تاثیر miR-143 در سمیت سلولی

میزان سمیت ۷۲ ساعته miR-143 بر روی رده های سلولی سرطانی و سالم استخوان در نمودار ۱ و شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. همان طور که نتایج نشان می دهد و انتظار می رفت سامانه لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به تنهایی هیچ سمیتی در هر دو رده سلولی SaOs-2 و Hum-63 نداشت. مطابق نتایج miR-143 چه به صورت آزاد و چه به صورت محصور در سامانه،



نمودار ۱: مقایسه سمیت سلولی miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143 پس از ۷۲ ساعت در سلول های سرطان استخوان (SaOs-2) و سلول های سالم استخوان (Hum-63). * نشان دهنده معنی داری در سطح $P < 0.05$ است.



شکل ۲: زیست پذیری و مورفولوژی رده سلولی Hum-63 تیمار شده با (A) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ آزاد و (B) miR-143 آزاد و (C) miR-143

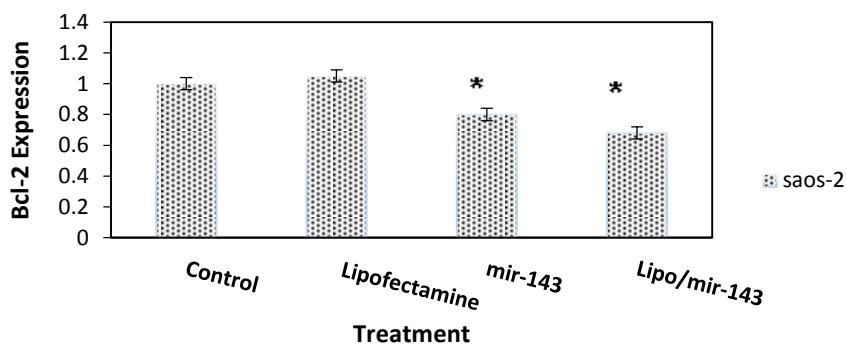


شکل ۳: زیست پذیری و مورفولوژی رده سلولی SaOs-2 تیمار شده با (A) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ آزاد و (B) miR-143 آزاد و (C) miR-143

کاهش در سلول‌های SaOs-2 بعد از تیمار با Lipo/ miR-143 مشاهده شد ($p<0.05$). نتایج نشان داد که ترانسفکشن سلولی miR-143 توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰ در مقایسه با تیمار سلول‌ها با miR-143 آزاد، باعث کاهش معنی‌دار بیشتری در بیان ژن *Bcl-2* می‌شود ($p<0.05$).

Real Time-PCR با تکنیک *Bcl-2* سنجش بیان ژن

بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های سرطانی استخوان (SaOs-2) به وسیله تکنیک Real time-PCR سنجیده شد. سلول‌ها با Lipo/ miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143 تیمار شدند. بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های SaOs-2 در اثر تیمار با Lipo/ miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143 کاهش یافته است. بیشترین



شکل ۵: سطح بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های SaOs-2 تیمار شده با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ آزاد و miR-143 آزاد

استخوان (Osteosarcoma) یکی از رایج‌ترین تومورهای بدخیم استخوان است و تقریباً شصت درصد از تمام انواع سرطان‌های استخوانی را شامل می‌شود (۱،۲). در حال حاضر برای درمان

بحث

سرطان یکی از دلایل اصلی مشکلات سلامتی و دلیل عمدۀ مرگ و میر در هر جامعه‌ای به شمار می‌رود. سرطان

نشان داد که miR-143 ژن HK2 (hexokinase-2) را تنظیم می‌کند. این ژن دارای فعالیت آنکوژنیک بوده و کاهش سطح پروتئین مهارکننده miR-143 باعث افزایش تکثیر سلولی سرطان کلیه (RCC) و تهاجم آنها از طریق HK2^m شود (۱۷). هم‌چنین Pamela و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کاسته شده miR-143 را در رده‌های سلولی از سرطان مثانه و پروسات نشان دادند. در این مطالعه مشخص شد که مسیر ERK5/MEK5 نقش بسیار مهمی در تکثیر، تهاجم سلول‌های سرطانی و متاستاز بازی می‌کند. miR-143 سطح پروتئین ERK5 و در نتیجه تکثیر سلولی را کاهش می‌دهد ولی در سرطان‌هایی مثل سرطان مثانه و پروسات به علت کاهش miR-143، فعالیت ERK5 و در نتیجه تکثیر سلولی سطح افزایش می‌یابد (۱۸). Ma و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۷ در گزارشات خود اظهار داشتند که miR-143 می‌تواند موجب کاهش بیان ژن Bcl-2 در سطح mRNA و پروتئین شده و در نتیجه موجب افزایش آپوپتوزیز در سلول‌های سرطان پروسات گردد (۱۹).

پروتئین Bcl-2 به طور کلی در مهار آپوپتوز سلولی نقش دارد. در صورت کاهش میزان بیان ژن مربوط به پروتئین Bcl-2، فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوزیز به واسطه فعال شدن فاکتورهایی از قبیل p53 شروع می‌شود. با در نظر گرفتن نقش کاسپازها در سلول‌های مختلف، مطالعات نشان داده‌اند که Bcl-2 بواسطه مهار سنتز و تولید کاسپازها نیز می‌تواند فرایند آپوپتوز را مهار نماید. به طور اختصاصی تر پروتئین‌هایی از جمله Bcl-2 موجود در دیواره میتوکندری‌ها بواسطه جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C یا با اتصال به Apaf-1 مانع از تشکیل آپوپتوزوم و به راه افتادن آبشار کاسپازی می‌شود (۱۲، ۱۴).

نتایج حاصل از بررسی سطح بیان mRNA مربوط به ژن Bcl-2 با استفاده از تکنیک RealtimePCR نشان داد که تیمار سلول‌های SaOs-2 به وسیله Lipo/ miR-143 می‌تواند موجب کاهش معنی داری در میزان بیان ژن Bcl-2 در سطح mRNA شود.

این سرطان از شیمی درمانی به عنوان روش درمانی موقت با استفاده از برخی داروهای خاص استفاده می‌شود که عوارض جانبی خاص خود را دارد. ژن درمانی یک استراتژی درمانی است که شامل وارد کردن اسیدهای نوکلئیک (پلاسمید، DNA، miRNA و یا siRNA) به سلول‌های انسانی برای دست یابی به اهداف درمانی است بنابراین اسیدهای نوکلئیک می‌توانند به عنوان دارو عمل کنند (۳، ۴، ۱۳، ۱۴).

miR-143 از جمله مهارکنندهای توموری مشهور است که از طریق تنظیم تعدادی از انکوژن‌ها، پیشرفت تومور را خنثی می‌کند. درمان جایگزین miRNA، سطح کاهش یافته mRNA را با مقلدهای اولیگونوکلئوتیدی با ترادف شبیه miRNA درونی کامل می‌کند (۶). مهم ترین مسئله در ژن miRNA درمانی، رسانش دست نخورده اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های miR-143 در این مطالعه هدف می‌باشد (۷). برای ترانسفکشن miR-143 به علت داشتن بار منفی با ممانعت غشای سلولی برای ورود آن روبرو بودیم لذا از لیپوفکتمین ۲۰۰۰ که یک سامانه لیپیدی کاتیونی تجاری است برای سهولت در ورود miRNA به داخل سلول و افزایش بازده ژن درمانی استفاده شد. در این مطالعه، نتایج حاصل از بررسی میزان جذب سلولی miR-143 به وسیله میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که جذب سلولی miR-143 به همراه لیپوفکتمین ۲۰۰۰ بسیار موثرتر از miR-143 آزاد است. که مطابق با یافته‌های Huang و همکاران در سال ۲۰۱۵ و Park و همکاران در سال ۲۰۱۱ است (۱۵، ۱۶).

نتایج تست MTT نشان داد که miR-143 چه به صورت آزاد و چه به صورت Lipo/ miR-143 رشد سلولی را کاهش داده اما فرم همراه با سامانه آن، سمیت بیشتری نشان داده است. و منجر به کاهش دوز مصرفی miRNA و هدف مندی آن شده است. این یافته‌ها مovid نقش مهارکنندگی miR-143 در رشد سلول‌های سرطانی استئومارکوما می‌باشد. این نتایج موافق با یافته‌های تحقیقی Yoshino و همکاران در سال ۲۰۱۳ است که نشان دادند miR-143 بطور معنی‌داری در چندین رده سلولی سرطانی به خصوص رده‌های سلولی سرطانی کلیه (RCC) تنظیم پایین (downregulation) می‌شود. این محقق

همکارانش در سال ۲۰۱۷ در گزارشات خود اظهار داشتند که miR-143 می‌تواند موجب کاهش بیان ژن *Bcl-2* و در نتیجه افزایش آپوپتوزیز در سلول‌های سرطان پروستات گردد (۲۲). این مطالعه تایید می‌کند که استفاده از miR-143 به صورت اگزوژن می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطانی استئوسارکومای انسانی را کاهش داده و هم‌چنین سطح بیان mRNA مربوط به ژن *Bcl-2* را کاهش دهد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد miR-143 از طریق هدف قرار دادن مسیرهای سلولی مختلفی از جمله میزان بیان ژن *Bcl-2* می‌تواند در درمان سرطان استخوان (استئوسارکوما) موثر واقع شود و به عنوان یک عامل درمانی جدید برای بیماران به خصوص آنهایی که به شیمی‌درمانی پاسخ ضعیف می‌دهند عمل کنده مشروط به تایید این نتایج در آزمایشات *In vivo* می‌باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر در پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوqi یزد انجام شده است، بدین وسیله نویسندها مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند. هزینه‌های این مطالعه به عهده پژوهشگران بوده است.

تعارض در منافع: نویسندها مقاله اظهار می‌دارند که در نوشتن مقاله سهم یکسان داشته و هیچ گونه تعارضی در منافع وجود ندارد.

مطالعات Hiroki و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که مهار اعضای آنتی آپوپتوزیک خانواده *Bcl-2* می‌تواند سلول‌های سرطانی پروستات را به داروی ضد سرطانی (DTX) حساس کند. آنتاکوئیست‌های اعضای آنتی آپوپتوزیک خانواده *Bcl-2* آپوپتوزیز وابسته به caspase8 را در سلول‌های سرطانی پروستات راه اندازی می‌کنند (۱۱). در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه‌ای به این نتیجه رسید که در سلول‌های سرطانی ریه، ترکیبات دود سیگار مثل نیکوتین و NNK (nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-(1-butanolone می‌توانند اعضای خانواده *Bcl-2* را از طریق چند مسیر سیگنالینگ تنظیم کنند. نیکوتین پروتئین‌های *Bcl-2* ، *ERK1/2*, *AKT* و *Bax* و *Mcl-1*, *Bad* را از مسیر فوریله می‌کند در نتیجه فعالیت آنتی آپوپتوزیکی این پروتئین‌ها افزایش یافته که خود موجب افزایش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی ریه شده و مقاومت آن‌ها را به شیمی‌درمانی افزایش می‌دهد (۲۰). هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نشان داده شد که گیاه دارویی HypericumjaponicumThunb با مهار پروتئین *Bcl-2* آپوپتوز را در سلول‌های سرطان خون افزایش می‌دهد. ترکیب A (Jac-A) Jacarelhypol از این گیاه برای باند شدن به دومین BH3 پروتئین *Bcl-2* با پروتئین‌های پروآپوپتوزیک به رقابت می‌پردازد (۲۱).

در آزمایشات Shen و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که افزایش سطح بیان miR-143 در سلول‌های سرطان خون می‌تواند باعث کاهش بیان ژن *Bcl-2* و *DNMT3A* و *Bcl-2* افزایش آپوپتوزیز در این سلول‌ها گردد. هم‌چنین Ma و

References:

- 1- Alexandrino EM, Ritz S, Marsico F, Baier G, Mailänder, V, Landfester K, et al. *Paclitaxel-loaded polyphosphate nanoparticles: a potential strategy for bone cancer treatment.* J Mater Chem B 2014; 2(10): 1298-306.

- 2- Haghiralsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-doulabi B. *A novel approach on drug delivery:*

- Investigation of new nano-formulation of liposomal doxorubicin and biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcomas cell lines.* Cell J 2017; 19: 55–65. [Persian]
- 3- Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. *Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma.* Cancer Lett 2013; 338(1): 158-67.
- 4- Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, Thomas DM. *Translational biology of osteosarcoma.* Nat Rev Cancer 2014; 14(11): 722-35.
- 5- Haghitalsadat F, Amoabediny G, Helder MN, Naderinezhad S, Sheikhha MH, Forouzanfar T, et al. *A comprehensive mathematical model of drug release kinetics from nano-liposomes, derived from optimization studies of cationic PEGylated liposomal doxorubicin formulations for drug-gene delivery.* Artif Cells Nanomed Biotechnol 2018; 46(1): 169-77. [Persian]
- 6- 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.
- 7- Gui T, Shen K. *miRNA-101: a potential target for tumor therapy.* Cancer epidemiol 2012; 36(6): 537-40.
- 8- Lin W, Zhumei S, Chengfei J, Xue L, Qiudan C, Xu Q, et al. *MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma.* Oncotarget 2014; 5: 5416- 27.
- 9- Wu XL, Cheng B, Li PY, Huang HJ, Zhao Q, Dan ZL, et al. *MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2.* World J Gastroenterol 2013; 19(43): 7758-65.
- 10- Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. *Progress in microRNA delivery.* J Control Release 2013; 172(3): 962-74.
- 11- Tamaki H1, Harashima N2, Hiraki M3, Arichi N3, Nishimura N4, Shiina H, et al. *Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition.* Oncotarget 2014; 5(22):11399- 412.
- 12- Plötz M, Gillissen B, Quast S-A, Berger A, Daniel PT, Eberle J. *The BH3-only protein Bim_L overrides Bcl-2-mediated apoptosis resistance in melanoma cells.* Cancer Lett 2013; 335(1):100-8.
- 13- Haghitalsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Zandieh-doulabi B, Naderinezhad S, Helder MN, et al. *New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma: drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity.* Chem Biol Drug Des 2017; 90(3): 368-79. [Persian]
- 14- Nourbakhsh M, Behravan J, Lage H, Abnous K, Badiee A, R Jaafari M. *Nanolipoparticles-mediated MDR1 siRNA delivery: preparation, characterization and cellular uptake.* Nanomed J 2015; 2(1): 39-45. [Persian]
- 15- Huang F, Zhao F, Laing L-P, Zhou M, QuZL, Cao YZ, et al. *Optomizing Transfection*

- Efficiency of Cervical Cancer Cells Transfected by Cationic Liposomes LipofectamineTM2000.* Asian Pac J Cancer Prev 2015; 16(17): 7749–54.
- 16-** Park J, Surendran S, M Kamendulis L, MorralN. *Comparative nucleic acid transfection efficacy in primary hepatocytes for gene silencing and functional studies.* BMC Res Notes 2011; 4:1-8.
- 17-** Yoshino H, Enokida H, Itesako T, Kojima S, Kinoshita T, Tatarano S, et al. *Tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster targets hexokinase-2 in renal cell carcinoma.* Cancer Sci 2013; 104(12):1567–74.
- 18-** Pamela A. Lochhead D, Rebecca G, Simon J. *ERK5 and its role in tumour development .* Biochem Soc Trans 2012; 40: 251–6.
- 19-** Ma Z, Luo Y, Qiu M. *miR-143 Induces the Apoptosis of Prostate Cancer LNCap Cells by Suppressing Bcl-2 Expression.* Med SciMonit, 2017; 23: 359-65.
- 20-** Deng X. *Bcl2 Family Functions as Signaling Target in Nicotine-/NNK-Induced Survival of Human Lung Cancer Cells.* Scientifica 2014; 2014: 1-7
- 21-** Zhang S, Yin J, Li X, Zhang J, Yue R, Diao Y, et al. *Jacarelhyperol A induced apoptosis in leukaemia cancer cell through inhibition the activity of Bcl-2 proteins.* BMC Cancer 2014; 14: 689-700.
- 22-** Shen JZ, Zhang YY, Fu HY, Wu DS, Zhou HR. *Overexpression of microRNA-143 inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cells.* Oncol Rep 2014; 31: 2035-2042.

Evaluation of the effect of liposomal miR-143 on cell viability and anti-apoptotic gene expression of *Bcl-2* in human osteosarcoma cells for the treatment of metastatic cancers

Fatemeh Barzegari Firouzabadi^{*1,2}, Shahrbanoo Oryan³,
Mohammad Hassan Sheikhha⁴, Seyed Mehdi Kalantar⁴, Ameneh Javed⁵

Original Article

Introduction: The present study was conducted to evaluate the effect of miR-143 on the expression of *Bcl2* gene at the level of mRNA, cell cytotoxicity in the SaOs-2 cell line (Osteosarcoma) and Hum 63 (Human primary bone cells).

Methods: In this experimental study, miR-143 was introduced into the SaOs-2 and Hum 63 cell by the lipofectam 2000 system. Then, the effects of miR-143 on cytotoxicity (72 hours) and expression of *Bcl2* gene were measured by the MTT tests and Real Time Pcr protocols, respectively.

Results: The results showed that the lipofectamine 2000 system had no toxicity in both Hum63 and SaOs2 cell lines by itself. SaOs2 cancer cells were more susceptible to miR-143 and Lipo / miR-143 compared to Hum63 cells. The highest reduction in SaOs2 cells was observed after the treatment with Lipo / miR-143 ($p < 0.05$). Furthermore, according to the results, transfection of miR-143 by lipofectamine 2000 into the cell, compared to cell-treated alone by miR-143, significantly reduced *Bcl2* expression ($p < 0.05$).

Conclusion: The lipoprotein 2000 system can be effective in absorbing miR-143 into the cells. By targeting various cellular pathways, including the expression level of the *Bcl2* gene, miR-143 can be effective in the treatment of bone cancer (Osteosarcoma).

Keywords: miR-143, Lipofectamin, *Bcl-2*, Osteosarcoma.

Citation: Barzegari Firouzabadi F, Oryan SH, Sheikhha MH, Kalantar SM, Javed A. Evaluation of the effect of liposomal miR-143 on cell viability and anti-apoptotic gene expression of *Bcl-2* in human osteosarcoma cells for the treatment of metastatic cancers. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(6): 542-52

¹Departeman of Biology, College of Science, Payame Noor University, Yazd, Iran

²Department of Biotechnology, Nano Structured Coatings Institute, Yazd Payame Noor University, Yazd, Iran³Department of

³Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

⁴Biotechnology Research Center, International Campus, ShahidSadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁵Biology Department, Science Faculty, Science and Art University, Yazd, Iran

*Corresponding author: Tel:09131599674, email:f.barzegary@gmail.com