

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

فاطمه برزگری فیروزآبادی^{۱*}، شهربانو عریان^۲، محمد حسن شیخ ها^۴، 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 SaOs-2 (از رده های استئوسارکوما) و Hum-63 (سلولهای سالم استخوان) انجام گرفت.

روش بررسی: 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 لیپوفکتامین 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 Student t-test برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آنها استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که سامانه لیپوفکتامین 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 لیپوفکتامین 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 لیپوفکتامین 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، لیپوفکتامین ۲۰۰۰، *Bcl-2*، استئوسارکوما

ارجاع: برزگری فیروزآبادی فاطمه، عریان شهربانو، شیخ ها محمد حسن، کلانتر سید مهدی، جاوید آمنه. ارزیابی اثرات miR-143 لیپوزومه بر زیست پذیری سلولی و بیان ژن آنتی آپوپتوتیک *BCL-2* در سلول های استئوسارکوماى انسانی جهت اثر گذاری بر درمان سرطان های متاستاتیک. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۶): ۵۲-۵۴

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

۲- گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده پوشش های نانو ساختار، 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: f.barzegary@gmail.com؛ کد پستی: ۸۹۱۵۱۱۶۵۸۴

miRNA 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 miRNA ها در سرطان های انسان آشکار کرده است که بسیاری از miRNA ها به عنوان مهارکننده های تومور عمل می کنند (۱۰-۶).

پروتئین های خانواده Bcl-2 در غشاء میتوکندری و شبکه آندوپلاسمیک جای گرفته اند. برخی از اعضای این خانواده (*Bcl-2*, *Bcl-x*) در مهارو برخی دیگر (*Bad*, *Bal*, *Bcl-*) *Bax* و *xs* در القای آپوپتوز نقش دارند. نسبت عوامل القاء کننده و مهارکننده 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 عمده ای در جلوگیری از شروع آپوپتوز بعد از تماس سلول های سرطانی با استرس های سیتوتوکسیک دارد.

بیان بالای *Bcl-2* مانع آپوپتوز می شود در نتیجه، مهار بیان *Bcl-2* می تواند دوباره 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 Hum-63 (سلول های سالم استخوان) 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 یکی از شایع ترین تومورها یا سرطان های بدخیم 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 پیرتر می شوند، کمتر دیده می شود. متاسفانه، 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).

تکنیک 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 miRNA به عنوان عامل مهمی در جلوگیری از گسترش سلول های سرطانی شناخته شده است (۳،۴،۵).

MicroRNAs (miRNA) شامل RNA های غیرکدکننده کوتاه (حدود ۲۱-۲۵ نوکلئوتید) می باشند که معمولاً به عنوان مهارکننده های mRNA های ژن های هدف عمل کرده و این کار را عمدتاً از طریق تأثیر بر ثبات و ترجمه mRNA 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 FAM-miRNA-143 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 (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 رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) انجام می‌شود. MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروناز 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 میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی در دمای 37°C و ۵ درصد کربن دی‌اکسید در انکوباتور مرطوب 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 تیمارهایی از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipo) miR-143،

۴ و ۶ دیامیدینو-۲-فیلیندول (DAPI)، محلول پارافرمالدئید ۴ درصد و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) و کیت سنتز cDNA (First Strand cDNA syntethis kit) از موسسه علمی ترمو فیشر (Waltham, Massachusetts, USA) تهیه گردید. تیازولیل بلو تترازولیوم بروماید (MTT)، has-miR-143، قرص فسفات بافر سالین (PBS, pH 7.0)، بی‌کربنات سدیم و تریپان بلو از شرکت سیگما آلدریج خریداری شد. کیت استخراج RNA (PureLink RNAMiniKit) از شرکت آمبیون (Ambion, Life technologies, USA) تهیه شد. کلروفورم، ایزوپروپانول و سایر ترکیبات شیمیایی از گرید آنالیتیکال بوده و از شرکت محصولات شیمیایی 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 انستیتو پاستور ایران خریداری شد و رده سلولی Hum-63 (از سلول‌های سالم استخوان) از طرف دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد اهدا شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM همراه با FBS ۱۰ درصد در فلاسک T25 کشت داده شدند و پس از انجام سه بار پاساژ موفقیت آمیز آزمایش‌های مورد نظر روی آن‌ها انجام گرفت.

بارگذاری miR-143 بر روی نانوسامانه لیپوفکتامین ۲۰۰۰

در ابتدا بر اساس پروتکل شرکت سازنده مقدار آب nuclease free مورد نیاز به محتویات داخل میکروتیوپ حاوی miR-143 اضافه و غلظت نهایی به 50nmol رسانده شد. انتقال miR-143 به داخل سلول جهت بررسی اثرات آن بر روی بیان ژن *Bcl-2* و سمیت سلولی با استفاده از لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipo) (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

5'-*GAPDH*(87bp)forward,
TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'and reverse, 5'-
GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

ژن خانه دار *GAPDH* به عنوان کنترل این آزمایش استفاده گردید و سی تی های 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 ANOVA و Student t-test برای آنالیز آماری نتایج آزمایشات و ارزیابی آن ها استفاده شد. معنی داری نتایج بر حسب $P\text{-value} < 0/05$ سنجیده شد.

ملاحظات اخلاقی

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

نتایج

بررسی میزان ورود سلولی *miR-143* Cellular Uptake

به منظور بررسی توانایی انتقال *miRNA* توسط لیپوفکتامین ۲۰۰۰۰ به درون سلول ها، ترنسفکشن سلولی *miR-143* Fam-labeled Lipo/ Hum-63 به رده های سلولی SaOs-2 و 63 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 SaOs-2 در مقایسه با سلول های سالم Hum-63 بیشتر می باشد که نشان دهنده جذب بیشتر *miR-143* Fam-labeled Lipo/ Hum-63 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 *miR-143* Lipo 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 هرچاهک اضافه شد. بعد از اتمام ۴ ساعته 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 (Biotek Instruments Inc. اندازه گیری و میزان درصد زندهمانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:
درصد زنده مانی سلولی =

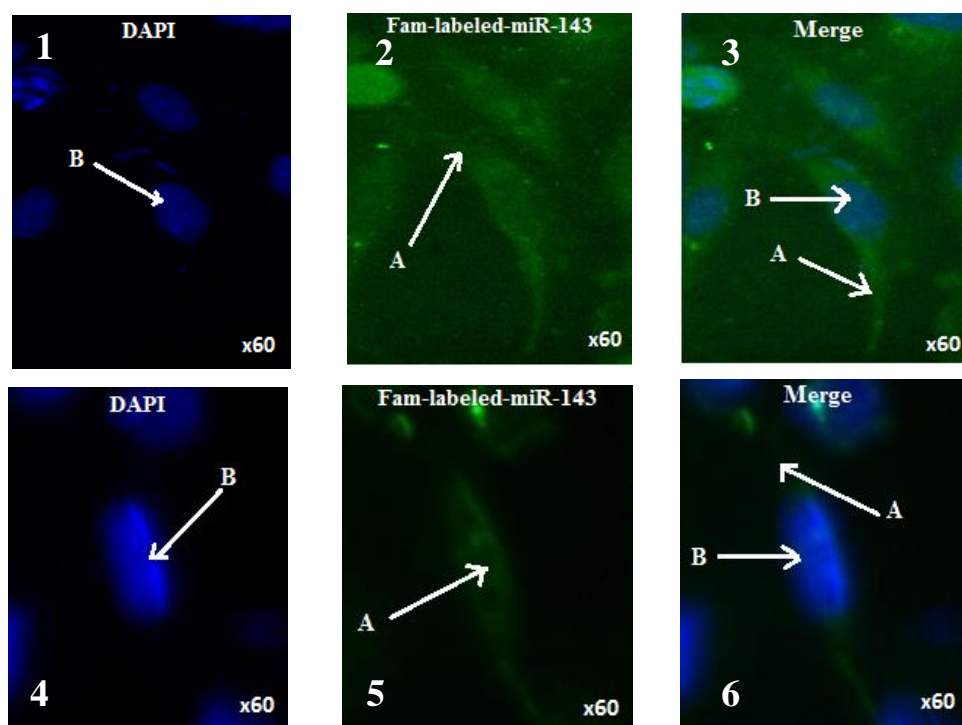
$$\frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت-میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت-میانگین جذب نوری در گروه کنترل}} \times 100$$

بررسی بیان ژن *Bcl-2* در سلول های سالم و سرطانی استخوان

میزان بیان ژن *Bcl-2* در رده های سلولی Hum-63 و SaOs-2 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 کیت *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) انجام گرفت. cDNA تازه تولید شده، توسط سکانس پرایمرهای زیر رونویسی گردید:

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

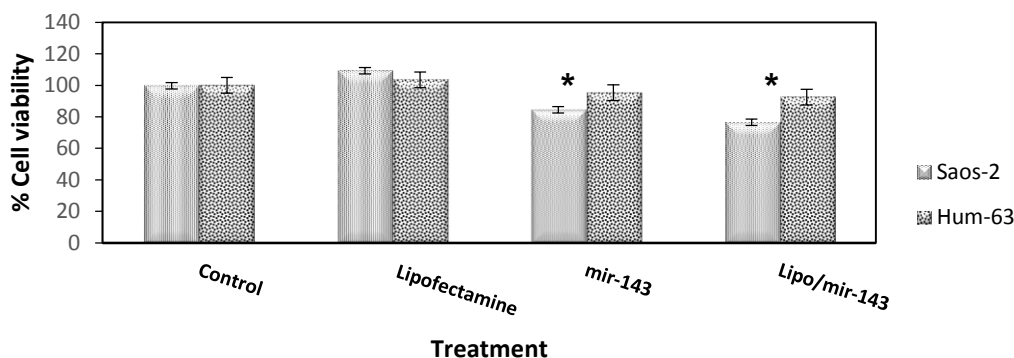


شکل ۱: ترانسفکشن Lipo/Fam-labeled miR-143 در سلول های SaOs-2 (1-3) و در سلول های Hum-63 (4-6). (A): تجمع Lipo/Fam- labeledmiR-143 در سیتوپلاسم سلول. (B): هسته که با DAPI رنگ آمیزی شده است.

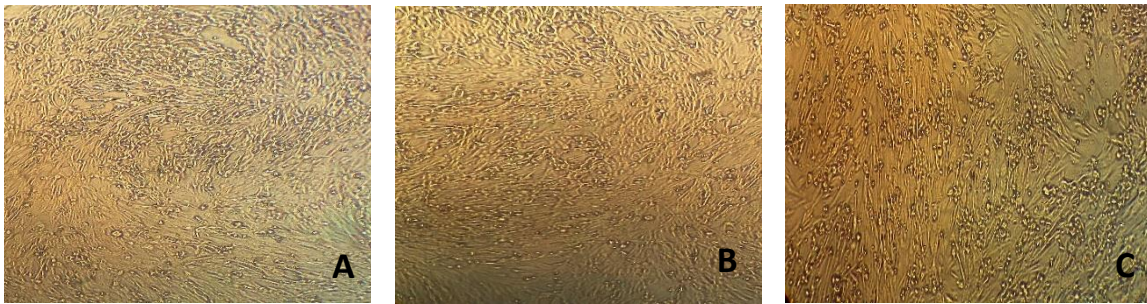
بررسی تاثیر miR-143 در سمیت سلولی

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 Hum-63 و SaOs-2 نداشت. مطابق نتایج miR-143 چه به صورت آزاد و چه به صورت محصور در سامانه،

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.



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 ۹۵٪ است ($P < 0.05$).



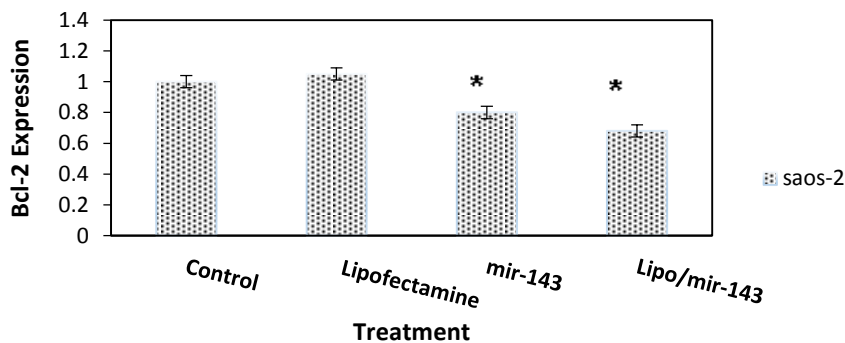
شکل ۲: زیست پذیری و مورفولوژی رده سلولی Hum-63 تیمار شده با (A) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (B) miR-143 آزاد و (C) Lipo/ miR-143



شکل ۳: زیست پذیری و مورفولوژی رده سلولی SaOs-2 تیمار شده با (A) لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (B) miR-143 آزاد و (C) Lipo/ 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 ($p < 0/05$).

سنجش بیان ژن *Bcl-2* با تکنیک Real Time-PCR
 بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های سرطانی استخوان (SaOs-2) به وسیله تکنیک Real time-PCR سنجیده شد. سلول‌ها با لیپوفکتامین ۲۰۰۰، miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143 تیمار شدند. بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های SaOs-2 در اثر تیمار با miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143 کاهش یافته است. بیشترین



شکل ۵: سطح بیان ژن *Bcl-2* در سلول‌های SaOs2 تیمار شده با لیپوفکتامین ۲۰۰۰، miR-143 آزاد و Lipo/ miR-143

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 عمده مرگ و میر در هر جامعه‌ای به شمار می‌رود. سرطان

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، یا siRNA) به سلول‌های انسانی برای دست‌یابی به اهداف درمانی است بنابراین اسیدهای نوکلئیک می‌توانند به عنوان دارو عمل کنند (۳،۴،۱۳،۱۴).

miR-143 از جمله مهارکننده‌های توموری مشهور است که از طریق تنظیم تعدادی از انکوژن‌ها، پیشرفت تومور را خنثی می‌کند. درمان جایگزین miRNA، سطح کاهش یافته miRNAها را با مقلدهای اولیگونوکلوئوتیدی با ترادف شبیه miRNA درونی کامل می‌کند (۶). مهم‌ترین مسئله در ژن درمانی، رسانش دست‌نخورده اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های هدف می‌باشد (۷). برای ترانسفکشن miR-143 در این مطالعه به علت داشتن بار منفی با ممانعت غشای سلولی برای ورود آن روبرو بودیم لذا از لیپوفکتامین 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 لیپوفکتامین 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 هدف‌مندی آن شده است. این یافته‌ها موید نقش مهارکنندگی miR-143 در رشد سلول‌های سرطانی استئوسارکوما 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

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 می‌شود (۱۷). هم‌چنین Pamela و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کاسته شده miR-143 را در رده‌های سلولی از سرطان مثانه و پروستات 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 پروستات به علت کاهش سطح miR-143، فعالیت ERK5 و در نتیجه تکثیر سلولی 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 آپوپتوز در سلول‌های سرطان پروستات 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 آپوپتوز 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 اختصاصی‌تر پروتئین‌های Bcl-2 موجود در دیواره میتوکندری‌ها بواسطه جلوگیری از رها شدن سیتوکروم C و 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 معنی‌داری در میزان بیان ژن Bcl-2 در سطح mRNA شود.

همکارانش در سال ۲۰۱۷ در گزارشات خود اظهار داشتند که miR-143 می تواند موجب کاهش بیان ژن *Bcl-2* و در نتیجه افزایش آپوپتوزیز در سلول های سرطان پروستات گردد (۲۲). این مطالعه تایید می کند که استفاده از miR-143 به صورت اگزوزن می تواند تکثیر سلول های سرطانی استئوسارکومای انسانی را کاهش داده و هم چنین سطح بیان mRNA مربوط به ژن *Bcl-2* را کاهش دهد.

نتیجه گیری

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

سپاسگزاری

مطالعه حاضر در پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد انجام شده است، بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارند. هزینه های این مطالعه به عهده پژوهشگران بوده است.

تعارض در منافع: نویسندگان مقاله اظهار می دارند 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 آپوپتوتیک خانواده *Bcl-2* می تواند سلول های سرطانی پروستات را به داروی ضد سرطانی (DTX Docetaxel) حساس کند. آنتاگونیست های اعضای آنتی آپوپتوتیک خانواده *Bcl-2* آپوپتوزیز وابسته به caspase 8 را در سلول های سرطانی پروستات راه اندازی می کنند (۱۱). Deng در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه ای به این نتیجه رسید که در سلول های سرطانی ریه، ترکیبات دود سیگار مثل نیکوتین و NNK (nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) می توانند اعضای خانواده *Bcl-2* را از طریق چند مسیر سیگنالینگ تنظیم کنند. نیکوتین پروتئین های *Bcl-2*، *Bad*، *Mcl-1* و *Bax* را از مسیر ERK1/2, AKT فسفوریل می کند در نتیجه فعالیت آنتی آپوپتوتیکی این پروتئین ها افزایش یافته که خود موجب افزایش زیست پذیری سلول های سرطانی ریه شده و مقاومت آن ها را به شیمی درمانی افزایش می دهد (۲۰). هم چنین در مطالعه ای که توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نشان داده شد که گیاه دارویی *Hypericum japonicum* Thunb با مهار پروتئین *Bcl-2*، آپوپتوز را در سلول های سرطان خون افزایش می دهد. ترکیب *Jacarelhyperol A* (Jac-A) از این گیاه باند شدن به دومین BH3 پروتئین *Bcl-2* با پروتئین های پروآپوپتوتیک به رقابت می پردازد (۲۱).

در آزمایشات Shen و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که افزایش سطح بیان miR-143 در سلول های سرطان خون می تواند باعث کاهش بیان ژن *Bcl-2*، *DNMT3A* و افزایش آپوپتوزیز در این سلول ها گردد. هم چنین Ma و

References:

- 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.
- Haghirsadat 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- Haghirsadat 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- Haghirsadat 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, Badiiee 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, Morral N. *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 Sci Monit, 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. *Jacarellhyperol 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, Iran⁻Department 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