

استفاده از miR-31-mimic جهت مهار متاستاز سرطان پستان در رده سلولی MDA-MB231 غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی

چکیده

سامیلا فرخی منش^۱
مهدی فروزنده‌مقدم^{۱*}
مرضیه ابراهیمی^۲

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران.

دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۳ آنلاین: ۱۳۹۳/۱۲/۲۰

زمینه و هدف: miRNA های مرتبط با متاستاز حوزه جدیدی از درمان‌های متاستاز بر اساس miR را ایجاد کرده که پتانسیل درمانی بالایی برای کشته‌ترین جنبه سرطان، یعنی متاستاز دارد. miR-31 یک miRNA ضد متاستازی با عملکرد پلئوتروپیک است که بیان آن در سلول‌های متاستاتیک سرطان پستان به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. این miRNA در چندین مرحله از آبشار متاستازی نقش دارد و استفاده از روش‌های بازیافت miR-31 می‌تواند روش کارآمدی برای مهار متاستاز باشد.

روش بررسی: نوع مطالعه مقطعی می‌باشد که در مهر سال ۹۳-۱۳۹۲ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. الیگوی دورشته‌ای miR-31 بالغ بر اساس دستورکار تولیدکننده کیت در وکتور pcDNA 6.2gw/EmGFP کلون شد. رده‌های سلولی سرطانی MDA-MB231 و MCF-7 پستان کشت داده شدند. miRNA آنها استخراج گردید و بیان miR-31 پیش از تیمار با سازه حاوی miR-31 در دو رده سلولی و سلول‌های نرمال بافت پستان تعیین شد. سپس سازه حاوی miR-31 به دو رده سلولی ترانسفکت شد. بیان miR-31 پس از ۴۸ ساعت ارزیابی شد و آزمایش‌های ایجاد خراش و سنجش مهاجم جهت ارزیابی میزان مهاجرت و تهاجم انجام شد.

یافته‌ها: نتایج Real-time polymerase chain reaction (PCR) پیش از ترانسفکشن سازه حاوی miR-31 کاهش چهار و بیش از ۱۰۰ برابری بیان miR-31 را به ترتیب در MCF-7 و MDA-MB231 نسبت به سلول‌های نرمال پستان نشان داد ولی بررسی بیان پس از ترانسفکشن سازه حاوی miR-31 به MDA-MB231 نشان‌دهنده افزایش قابل توجه در بیان miR-31 و کاهش ۲۰ برابری خصوصیات مهاجمی و ۱۰ برابری خصوصیت مهاجرتی نسبت به MCF-7 بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از miR-31 در درمان بر اساس بازیافت miR-31-mimic امکان مهار کارآمد متاستاز را مطرح می‌کند.

کلمات کلیدی: miR31-mimic، متاستاز، سرطان پستان.

* نویسنده مسئول: تهران، تقاطع بزرگراه چمران و جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۳۳۸۶۱
E-mail: foroz@modares.ac.ir

مقدمه

در می‌نوردد روش‌های مذکور یا بی‌نتیجه بوده و یا خود کمک به تسریع مرگ می‌کند. میزان بقای پنج‌ساله برای سرطان پستان از ۱۰٪ وقتی متمرکز است به کمتر از ۲۵٪ وقتی منتشر است کاهش می‌یابد.^۱ در نتیجه مهمترین دستاورد در درمان سرطان مهار متاستاز خواهد بود. متاستاز یک فرایند چند مرحله‌ای شامل جدا شدن سلول بنیادی سرطانی از تومور اولیه، تخریب غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی

سرطان پستان شایعترین بدخیمی با بالاترین میزان بروز در بین زنان در سرتاسر دنیا است. عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان پیچیدگی‌های ناشی از متاستاز است.^۱ تومورهای اولیه بیشتر بزرگ بوده و در کنار بافت مبتلا هستند و به‌وسیله جراحی یا پرتوتابی قابل برداشت یا حذف می‌باشند، ولی وقتی تومور مرزهای فیزیولوژیک را

یک مسیر را هدف قرار دهند. همچنین miRNA ها مولکول‌های کوچکی هستند و آنتی ژنیسته کمتری نسبت به پپتیدها و پروتیین‌ها دارند.^{۱۱،۱۲} یکی از مهمترین MetastamiR هایی که بیانش در سرطان پستان مناساتیک به شدت کاهش می‌یابد miR-31 می‌باشد. در واقع miR-31 microRNA ای با عملکرد Pleiotropic است و مناساتاز سرطان پستان را مهار می‌کند و تعدادی ژن پیش مناساتازی مثل Fzd3, RhoA و ITGA5, M-RIP, Matrix metalloproteinase-16, RDX Fzd3, ITGA5, به‌عنوان اهداف آن معرفی شده‌اند. در بین این اهداف RhoA و RDX می‌توانند تا حدی فنوتیپ مرتبط با مناساتاز وابسته به miR-31 را برگردانند. بنابراین miR-31 از طریق خاموش کردن این ژن‌ها پس از رونویسی (Post-transcriptional silencing) مناساتاز را مهار می‌کند. در کل این microRNA چندین مرحله از مناساتاز شامل مهاجم، Anoikis و کلونیزاسیون را مهار می‌کند.^{۱۳} پژوهش‌های فراوانی جهت استفاده از miR ها در درمان صورت گرفته است. بیان نرمال miRNA هایی که از ژنوم حذف می‌شوند و یا بیانشان کاهش پیدا می‌کند را می‌توان به‌وسیله روش‌های درمانی با اساس بازیافت miR یعنی (miRNA restoration based therapy) با استفاده از miRNA-mimic یا miRNA-mimetic ها بازگرداند. اینها مولکول‌های RNA دو رشته‌ای هستند. رشته رهبر به‌طور کامل مانند miRNA بالغ درون سلولی است که بیانش باید بازیافت گردد و رشته پیشرو مکمل رشته رهبر است. بر خلاف anti-miR ها که می‌توانند به‌صورت عریان انتقال پیدا کنند، miR-mimic ها به‌طور معمول یا کونژوگه می‌شوند و یا در حاملینی قرار می‌گیرند.^{۱۴} یکی از بهترین روش‌های انتقال، روش انتقال miR-mimic با لیپوزوم‌ها می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان مهار مهاجم سلولی با استفاده از بازیافت بیان miR-31 در سلول‌های مناساتاتیک پستان است.^{۱۵}

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مقطعی بود که در سال ۹۳-۱۳۹۲ در دانشگاه تربیت مدرس، تهران انجام شد. کشت دو رده سلولی سرطان پستان: رده سلولی MCF-7 از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (Iranian Biological Resources Center, IBRC, Tehran, Iran) از بانک سلولی

به‌وسیله پروتیینازها، داخل شدن به رگ‌های کنار تومور، حمل شدن در یک سیستم رگی و گیر افتادن در یک بستر رگی و خارج شدن از آن و در نهایت ایجاد تومور ثانویه می‌باشد.^{۳،۴} متاسفانه وقتی مناساتاز از نظر بالینی شناسایی می‌شود که درمان‌های در دسترس برای بیماران به‌طور عمده موقتی بوده و در اکثریت موارد امکان بقای درازمدت نادر است. استراتژی‌های موثر جهت مهار و کنترل پیشرفت مناساتاز نیاز به فهم دقیق مکانیسم مولکولی مناساتاز، اندرکنش میزبان- تومور و مولکول‌های تنظیم‌کننده‌ای که فرایند مناساتاز را در مراحل مختلف تنظیم می‌کنند دارد.^۵

از آنجایی که مناساتاز یک فرایند چند مرحله‌ای است هر مرحله نیاز به تنظیم دقیق دارد. کشف miRNA ها مولکول‌های کوچک RNA غیر کدکننده، به‌عنوان تنظیم‌کنندگان اصلی ژن، امید توسعه راهکارهای قدرتمندتر و موثرتر را در حوزه مهار مناساتاز در سرطان‌ها ایجاد کرده است.^۶ این مولکول‌ها مهار بیان ژن‌ها را از طریق اندرکنش‌های مختص توالی با 3' نواحی غیر قابل ترجمه mRNA مرتبط پس از رونویسی انجام می‌دهند.^۷ metastamiR خانواده‌ای از miRNA ها هستند که در تنظیم مراحل مختلف مهاجرت و مهاجم سلولی نقش دارند و در ایجاد تومور نقشی ندارند.^{۸،۹} مشخص شده که خانواده metastamiR دارای اثرات پیش و آنتی مناساتازی است و بر اساس پژوهش‌های اخیر، این خانواده در تنظیم و کنترل مناساتاز بسیار حایز اهمیت هستند. اعضای این خانواده به دو دسته فعال‌کنندگان و مهارکنندگان مناساتاز تقسیم می‌شوند. میزان نابهنجار اینها در تومورها پیامدهای پاتوژنیک مهمی دارد.

miRNA هایی که در مناساتاز میزان بیانشان افزایش می‌یابد با کاهش بیان مهارکنندگان مناساتاز کمک به پیشرفت مناساتاز می‌کنند و آنهایی که بیانشان کاهش پیدا می‌کند با افزایش بیان فعال‌کنندگان مناساتاز سبب پیشبرد مناساتاز می‌شوند. miRNA های مرتبط با سرطان پایین دست ژن‌های اصلی مهارکننده یا پیشبرنده مناساتاز قرار دارند.^{۱۰} استفاده از miRNA در درمان مزایایی بر دیگر روش‌ها دارد به‌عنوان مثال استفاده از یک مولکول کوچک برای هدف قرار دادن یک پروتیین یا آنزیم می‌تواند سبب به‌وجود آمدن مکانیسم‌های جبرانی در همان مسیر گردد. در استفاده از miRNA ها احتمال اینکه چنین مکانیسمی ایجاد شود کمتر است چون miRNA ها در یک زمان می‌توانند مسیرهای چندگانه را تحت تاثیر قرار داده یا اجزای مختلف

شد (Pellet B). حدود ۵-۱ ml از محلول از پیش گرم‌شده‌ی Trypsin/ EDTA به پلت‌های A و B اضافه شد و به مدت ۳-۱ دقیقه با سرسمپلر آبی پیپتینگ صورت گرفت. سپس ۱۰ ml از محلول سرد Hank's buffer+ 2% FBS جهت خنثی کردن تریپسین اضافه شده و سانتیفریوژ در $350 \times g$ به مدت پنج دقیقه انجام شد. تا حد امکان مایع رویی حذف گردید. ۲ ml Dispase از پیش گرم‌شده با غلظت ۵ mg/ml و $200 \mu l$ Deoxyribonuclease I (DNase I) از پیش گرم‌شده با غلظت ۱ mg/ml به پلت اضافه شده و به مدت یک دقیقه پیپتینگ صورت گرفت. سپس سوسپانسیون با ۱۰ ml از محلول سرد Hank's buffer رقیق شده و از صافی سلولی $40 \mu m$ عبور داده شد. سانتیفریوژ در $350 \times g$ و به مدت پنج دقیقه انجام شد و مایع رویی تا حد امکان دور ریخته شد. ۱ ml محیط کشت به پلت اضافه شد و شمارش سلولی صورت گرفت. برای تایید بالا بودن درصد سلول‌های CD44+CD24- در رده MDA-MB231 و مشخص شدن درصد این سلول‌ها در MCF-7 و سلول‌های نرمال بافت پستان فلوسایتومتری انجام شد. به این ترتیب که ابتدا سلول‌ها شمارش شدند سپس تعداد 10^6 سلول در ۱ ml بافر PBS ریخته شد و این بافر به چهار قسمت مساوی تقسیم گردید. یک بخش به‌عنوان کنترل منفی شامل آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل PE (eBioscience, San Diego CA) و ایزوتایپ کنترل Fluorescein isothiocyanate (FITC) (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) بود یک بخش شامل آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل PE (Phycoerythrin) و Anti-CD24 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) کونژوگه با FITC، بخش دیگر شامل آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل FITC و Anti-CD44 کونژوگه با PE و بخش آخر که شامل آنتی‌بادی‌های Anti-CD24 کونژوگه با FITC و Anti-CD44 کونژوگه با PE بود. نتایج به‌وسیله WinMDI software version 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) مورد بررسی قرار گرفت. جهت طراحی miR-31-mimic ابتدا توالی miR-31 بالغ از پایگاه اطلاعاتی miRBase گرفته شد. طراحی الیگومر miR-31-mimic بر اساس دستورکار کیت وکتور pcDNA 6.2gw/EmGFP (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) صورت گرفت و جهت سنتز به (Fazatehran, Iran) فرستاده شد. هیبریداسیون دو رشته الیگومر با استفاده از واکنش اتصال با غلظت $1 \mu M$ از دو رشته بالا و پایین و 10X oligo annealing buffer و آب

(Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran) دریافت گردید. محیط کشت MCF-7 محیط DMEM/F12 کامل شده با ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین می‌باشد. کشت MDA-MB231 در محیط RPMI با ۱۰٪ FBS و ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین انجام می‌شود. تمام مواد لازم جهت کشت از شرکت Gibco, Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) فراهم گردید.^{۱۶}

نمونه سلول‌های نرمال بافت پستان از بیمارستان میلاد و بر اساس مصوبات کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و بیمارستان میلاد انجام شد. از افراد رضایت‌نامه جهت استفاده از بافت گرفته شد. نمونه‌برداری جهت سلول‌های نرمال به‌وسیله جراح متخصص بعد از برداشت کامل تومور از بافت اطراف تومور خانم‌های مبتلا به سرطان سینه و یا از خانم‌های مبتلا به فیبروم انجام شد. این افراد در محدوده سنی ۵۰ تا ۶۰ سال بودند. ابتدا برای هر نمونه حدود ۲۰ ml از محیط انتقال (۵٪ FBS + DMEM/F12 + محلول آنتی‌بیوتیک ۲X) ساخته شد و به درون فالكون ۵۰ ml استریل Falcon™ 50mL Conical Centrifuge Tubes (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ریخته شد. فالكون‌ها در شرایط استریل و دمای $4^{\circ}C$ به آزمایشگاه انتقال داده شد.

در زیر هود لامینار نمونه‌ی بافتی از داخل فالكون به پتری دیش شیشه‌ای منتقل شد. ابتدا دو تا سه بار با PBS استریل شسته شد تا خون حذف شود. سپس توسط قیچی استریل و تیغ جراحی بافت چربی جدا شد. روی بافت باقیمانده مقداری محیط DMED/F12 ریخته شد تا بافت خشک نشود. سپس توسط تیغ جراحی بافت به قطعات ریز (در حدود $2-1 \text{ mm}^3$) تبدیل شد. بافت قطعه‌شده به درون یک فالكون ۱۵ ml حاوی محیط هضمی (شامل DMED/F12 و آنزیم کلاژناز/ هیالورونیداز به نسبت ۹:۱، ۱٪ FBS، محلول آنتی‌بیوتیکی ۲X) ریخته شد. به ازای هر ۳ g نمونه‌ی بافتی حدود ۵ ml از محیط هضمی مورد نیاز است. در فالكون به‌طور کامل بسته شد و به مدت ۲۴ ساعت در $37^{\circ}C$ و در حال لرزش شدن قرار داده شد. روز بعد فالكون حاوی نمونه‌ی هضم‌شده در $80 \times g$ (80 times Earth's gravitational force) و به مدت ۳۰ s سانتیفریوژ شد. لایه‌های چربی حذف گردید، مایع رویی (Supernatant) به یک فالكون جدید منتقل شد و پلت نگه داشته شد (Pellet A). در مرحله‌ی بعد مایع رویی در $200 \times g$ به مدت سه دقیقه سانتیفریوژ شده و پلت نگه داشته

بیان نسبی ژن از روش Pfaffl استفاده شد.^{۱۷}

دو رده سلولی در پلیت شش خانه به صورت دوتایی (Duplicate) کشت داده شدند و پس از رسیدن به Confluency ۶۰٪ با دو وکتور فاقد miR و حاوی miR ترانسفکت شدند سپس به سلول‌ها زمان داده شد تا کف پلیت را پر کنند سپس یک دسته از سلول‌ها جهت آنالیز فلوسایتومتری برای مشخص شدن نرخ ترانسفکشن و دسته دیگر جهت آزمون ایجاد خراش مورد استفاده قرار گرفتند.

برای انجام این تست به‌وسیله نوک سرسمپلر خط عمودی در راستای قطر پلیت شش خانه ایجاد کرده و جهت برداشت سلول‌های جدا شده کف پلیت به آرامی با محیط کشت بدون FBS شستشو داده شد. سپس در ساعت‌های صفر و ۲۴، عکسبرداری انجام شد. در رده سلولی MDA-MB231 تست ایجاد خراش در سه حالت سلول بدون وکتور، سلول حاوی وکتور بدون miR و سلول حاوی وکتور دارای miR به صورت دوتایی انجام شد که یک دسته جهت بررسی فلوسایتومتری جهت مشخص شدن میزان ترانسفکشن و دسته دیگر برای تست ایجاد خراش مورد استفاده قرار گرفت.

میزان مهاجرت سلولی به درون خراش در ساعت‌های گفته‌شده با HCS Studio™ 2.0 Cell Analysis Software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) محاسبه شد. به این صورت که فاصله بین دو لبه خراش توسط نرم‌افزار اندازه‌گیری شده و در فرمول بسته شدن زخم قرار گرفت.^{۱۸}

بررسی میزان تهاجم در این سلول‌ها با استفاده از فیلترهای با قطر منافذ ۰/۸ μm که در روی آن Matrigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) پوشش داده شده بود و در داخل پلیت ۲۴ خانه قرار گرفته بود انجام شد. سلول‌های ترانسفکت شده در سه دسته وکتور کنترل، وکتور حاوی miR و سلول‌های بدون وکتور به تعداد ۲۵۰۰۰ در محیط حاوی سرم در قسمت بالای فیلتر اضافه می‌شوند. برای هر یک از این سه دسته چهار چاهک در نظر گرفته می‌شود که در دو چاهک روی فیلتر ماتریژل اضافه می‌شود ولی در قسمت پایین، یکی از چاهک‌ها حاوی محیط دارای سرم است و دیگری دارای محیط فاقد سرم و دو چاهک دیگر فاقد ماتریژل و یکی دارای محیط حاوی سرم و دیگری دارای محیط فاقد سرم می‌باشد.

پس از اینکه سلول‌ها روی فیلتر قرار گرفتند ۲۴ ساعت انکوبه شده از محیط کشت خارج شده و سپس قسمت پایین فیلتر در پارافرمالید

فاقد RNase و DNase بر اساس دستورکار کیت انجام شد و تایید هیبرید شدن دو رشته به‌وسیله الکتروفورز با مارکر DNA ۵۰ bp صورت گرفت.

اتصال آنزیمی قطعات دو رشته‌ای به وکتور با واکنش لیگاسیون شامل بافر لیگاسیون ۵X، وکتور pcDNA 6.2gw/EmGFP با غلظت ۵ ng/μl، الیگوی دو رشته‌ای با غلظت ۱۰ nM، آب فاقد RNase و DNase و آنزیم T4DNA ligase با غلظت ۱ U/μl انجام شد و به‌وسیله انتقال الکتریکی به باکتری مستعد وارد شد. تایید کلونینگ با روش کلونی PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی وکتور صورت گرفت که نتایج PCR روی ژل الکتروفورز بررسی شد. وکتور تخلیص شده از باکتری مستعد جهت تایید نهایی برای تعیین توالی فرستاده شد.

ترانسفکشن دو رده سلولی و بررسی میزان ترانسفکشن از طریق پروتیین سبز فلورسنت (GFP) با روش فلوسایتومتری: از هر رده سلولی ۵×۱۰^۴ سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و پس از رسیدن به تراکم ۶۰٪ با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) و دو وکتور pcDNA 6.2gw/EmGFP حاوی miR-31 و بدون miR-31 (به‌عنوان کنترل مثبت) با غلظت ۰/۸ μg ترانسفکت گردیدند. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌ها به‌وسیله تریپسین ۰/۲۵٪ از کف پلیت کنده شدند و برای مشخص شدن نرخ ترانسفکشن میزان بیان GFP به‌وسیله فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری با FlowJo software, version 9.5.3 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) تحلیل شد.

miRNA دو رده سلولی و سلول‌های نرمال بافت پستان پیش و پس از تیمار (پس از تیمار فقط miRNA دو رده سلولی استخراج گردید) با دو وکتور حاوی miR و فاقد miR به‌وسیله miRCURY RNA isolation kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) استخراج گردید. سنتز cDNA به‌وسیله کیت Universal cDNA Synthesis (Exiqon, Vedbaek, Denmark) انجام شد.

Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان miR-31 بالغ به‌وسیله Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Brisbane, Australia) و کیت miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR و پرایمرهای LNA microRNA-31 (Exiqon, Vedbaek, Denmark) انجام شد و از RNA کوچک هسته‌ای U6 به‌عنوان کنترل درونی استفاده شد. واکنش‌ها به صورت دوتایی بود و میانگین آن ارایه شد. برای اندازه‌گیری و مقدار

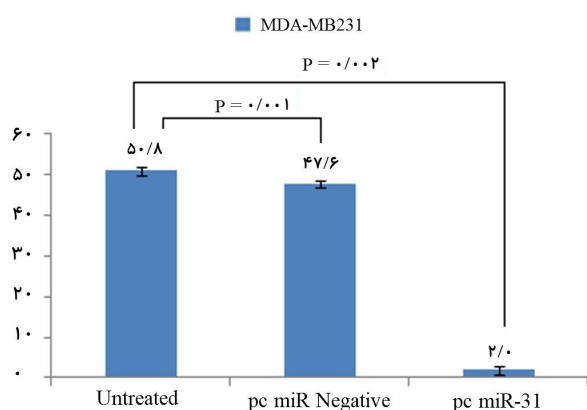
miR ابتدا به وسیله رنگ کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شده و ۱۰٪ فیکس شده و به منطقه یک چاهک برداشته شد. به منظور محاسبه میزان تهاجم شمارش سلول‌ها در دو حالت مختلف در پلیت ۲۴ خانه یعنی ۱- ماتریژل با FBS، ۲- بدون ماتریژل با FBS در ۱۰ منطقه مختلف با ImageJ software version 1.40g (Wayne Rasband, NIH, USA) انجام گرفت و نتایج در فرمول میزان تهاجم که شامل تعداد سلول‌ها در حالت دارای ماتریژل و FBS تقسیم بر تعداد سلول‌ها در حالت بدون ماتریژل و دارای FBS می‌باشد قرار گرفت.^{۱۹}

یافته‌ها

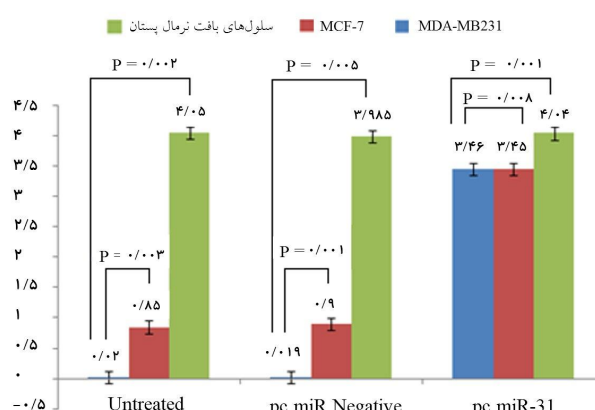
هیبریداسیون رشته‌های miR-mimic و کلونینگ آن در وکتور pcDNA 6.2gw/EmGFP تایید هیبریداسیون دو رشته با استفاده از الکتروفورز انجام شد. پس از کلونینگ کلونی مناسب با استفاده از کلونی PCR انتخاب گردید و پلاسمید حاصله تخلیص گردید. ایمونوفلوسایتومتری تاییدی: درصد جمعیت سلولی CD44⁺CD24⁻ در رده‌های سلولی MDA-MB-231، MCF-7 و سلول‌های بافت نرمال پستان به ترتیب ۸۸٪، ۲۵٪ و ۱۱٪ کل جمعیت سلولی می‌باشد. ترانسفکشن دو رده سلولی با وکتور فاقد miR و دارای

نتایج Real time PCR با پرایمر LNA microRNA-31 پیش از ترانسفکشن سلول‌ها با سازه حاوی miR-31 نشان‌دهنده از دست رفتن بیان این miRNA در MDA-MB231 ۱۷۳ برابر و در MCF-7 در حدود چهار برابر نسبت به سلول‌های نرمال بافت پستان بود. همچنین بررسی میزان بیان پس از تیمار با وکتورهای فاقد و دارای miR نشان‌دهنده افزایش قابل توجه بیان در MDA-MB231 و رسیدن به بیانی در حدود سلول‌های نرمال بافت پستان بود (نمودار ۱).

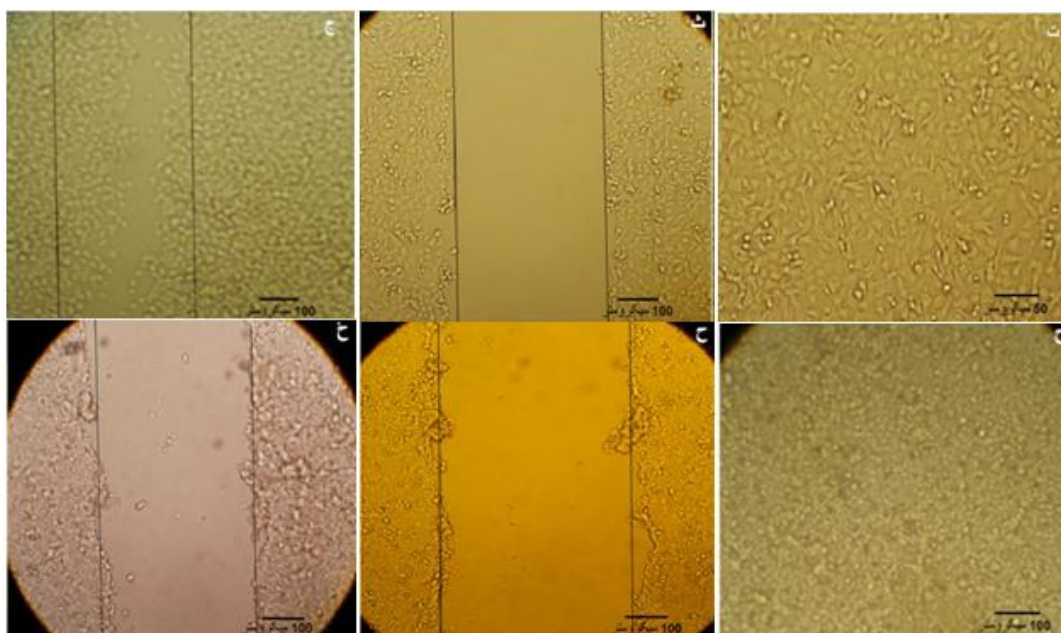
در این تست از هر دو دسته رده سلولی پیش از ترانسفکشن در لحظه ایجاد خراش و ۲۴ ساعت پس از عکسبرداری صورت گرفت. از آنجایی که در رده MCF-7 میزان مهاجرت در حد قابل توجهی نبود دیگر در حالت ترانسفکشن شده با وکتور بررسی ایجاد خراش روی آنها صورت نگرفت. نتایج مشخص کرد که میزان مهاجرت سلول‌های MDA-MB231 در حالت تیمار نشده با وکتور ۱۰ برابر سلول‌های MCF-7 بود و پس از تیمار با وکتور کاهش میزان مهاجرت به چهار تا پنج برابر کاهش یافت (شکل ۱).



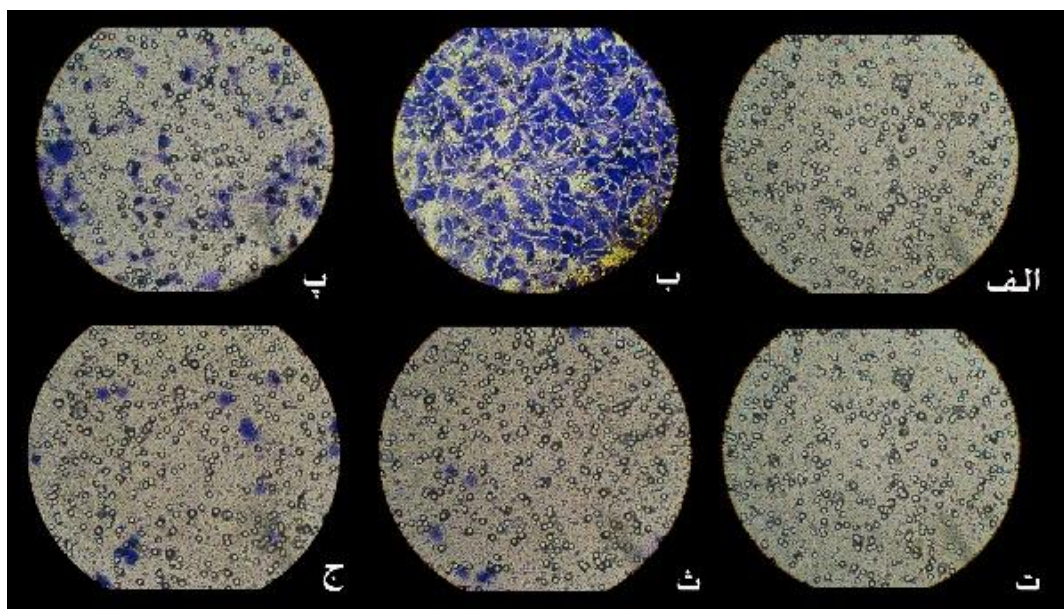
نمودار ۲: درصد تهاجم سلول‌های MDA-MB231 در حالت تیمار نشده، در حالت تیمار با وکتور بدون miR و در حالت تیمار با وکتور حاوی miR میزان P-value برای تایید داده‌ها از لحاظ آماری محاسبه شد. در اینجا متغیر پیوسته نسبت به گروه تیمار نشده و تنها با تفاوت یک فاکتور متغیر محاسبه و بر روی هر ستون مشخص شد.



نمودار ۱: مقایسه بیان miR-31 در دو رده سلولی و سلول نرمال سینه در حالت‌های بدون تیمار، تیمار با وکتور بدون miR-31 و تیمار با وکتور حاوی miR-31 در دو رده MDA-MB231 و MCF-7 میزان P-value برای تایید داده‌ها از لحاظ آماری محاسبه شد. کلیه متغیرهای پیوسته نسبت به رده مناسب‌تایک و تنها با تفاوت یک فاکتور متغیر محاسبه و بر روی هر ستون مشخص شد.



شکل ۱: ردیف اول سلول‌های MDA-MB231 ت: پیش از ایجاد خراش، ث: زمان ایجاد خراش، ج: ۲۴ ساعت پس از ایجاد خراش. ردیف دوم سلول‌های MCF-7 ج: پیش از ایجاد خراش، ح: زمان ایجاد خراش، خ: ۲۴ ساعت پس از ایجاد خراش



شکل ۲: آزمون تهاجم سلولی:

الف، ب، پ: زمان‌های به ترتیب صفر، سلول تیمارنشده با سازه حاوی miR-31 بعد از ۲۴ ساعت، سلول تیمارنشده با سازه حاوی miR-31 بعد از ۲۴ ساعت در رده MDA-MB231
ت، ث، ج: زمان‌های به ترتیب صفر، سلول تیمارنشده با سازه حاوی miR-31 بعد از ۲۴ ساعت، سلول تیمارنشده با سازه حاوی miR-31 بعد از ۲۴ ساعت در رده MCF-7

روش درمان با اساس miRNA به وجود آمده است: Antagonist و mimic. آنتاگونیست‌ها برای مهار عملکرد miRNA ای که عملکردی را کسب کرده و mimic ها برای بازیافت عملکرد miRNA هایی که فقدان عملکرد را نشان می‌دهد به کار می‌روند.^{۲۲} بازیافت بیان مهارکنندگان توموری از پیش به وسیله ژن درمانی انجام می‌شد که مشکلات زیادی مانند سایز بزرگ سازه به دلیل اندازه بزرگ ژن‌های کدکننده پروتیین، ناکارایی انتقال به بافت هدف و نیاز به قرار گرفتن در هسته چالش‌های تکنیکی بود که کاربرد این روش را محدود می‌کرد، ولی miRNA-mimic های مهارکننده توموری برخلاف ژن‌ها کوچک هستند و نیازی به ورود به هسته جهت انجام عملکرد خود ندارند و در سیتوپلاسم فعال هستند و به وسیله روش‌هایی که جهت انتقال siRNA استفاده می‌شود انتقال می‌یابند، با در نظر گرفتن این مسایل بر ژن درمانی ارجحیت دارند.^{۲۴،۲۳} به علاوه بر اساس پژوهش‌های انجام‌شده روش‌های مبتنی بر miR-mimic نسبت به روش‌های آنتاگونیستی یا آنتاگومیرها مزایایی دارند:

۱- اکثریت miRNA هایی که بیانشان در بافت سرطانی در مقایسه با بافت نرمال دچار اختلال می‌شود دچار کاهش بیان می‌شوند که نشان‌دهنده این است که تعداد miRNA های تومور ساپرسور نسبت به miRNA های انکوژن بیشتر است. ۲- مهار پردازش miRNA های درون‌زاد سبب القای ترانسفورماسیون‌های انکوژنیک و تشدید تومورزایی می‌شود که این نشان‌دهنده برتری نقش مهاری بر نقش انکوژنیک است. ۳- مزیت دیگر miR-mimic ها بر آنتاگومیرها این است که miR-mimic ها توالی یکسان با miR درون‌زاد و طبیعی از دست رفته دارند و بنابراین هدف اینها هم همان mRNA هایی است که miRNA های طبیعی هدفگیری می‌کنند.^{۲۶،۲۵}

به علاوه بیان غیر اختصاصی اینها در سلول‌های نرمال هم مشکلی ایجاد نمی‌کند چون ۱- مسیرهایی که به وسیله miR-mimic ها مهار یا فعال می‌شود از پیش به وسیله miRNA طبیعی خود سلول مهار یا فعال گشته است. ۲- به کار بردن miR-mimic درمانی باعث افزایش خفیف در آنچه که از پیش در سلول فعال بوده می‌گردد. ۳- سلول‌های نرمال وابسته به مسیرهای انکوژنیک نیستند و سعی بر بازیافت خود در مقابل دوز درمانی دریافتی می‌کنند. ۴- سلول‌های نرمال می‌توانند فعالیت و حضور miR-mimic ها را تنظیم کنند ولی سلول‌های سرطانی چنین قابلیت ندارند.^{۲۷}

نتایج بررسی تهاجم تاییدکننده تست ایجاد خراش بود و چون رده MCF-7 در حالت نرمال میزان تهاجم قابل توجهی نداشت، در حالت ترانسفکت شده مورد بررسی قرار نگرفت. در رده سلولی MDA-MB231 در هر سه حالت بدون وکتور و حاوی دو نوع وکتور، تست تهاجم انجام شد و نتایج تست حاکی از کاهش ۲۰ برابری میزان تهاجم در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور حاوی miR-31 بود (نمودار ۲ و شکل ۲).

بحث

ده‌ها سال پژوهش‌های miRNA- سرطان منجر به کشف پتانسیل درمانی miRNA ها گردید. این پژوهش‌ها شاهدهی بر این مدعاست که miRNA ها به‌عنوان اهداف فارماکولوژیک دارای اثراتی افزون بر درمان‌های حال حاضرند.^{۱۲}

پژوهش‌های گسترده ژنوم کاهش بیان یا حذف لوکوس ژنومی miR-31 را در بسیاری از سرطان‌های پستان مشخص کرده است.^{۱۱} در این مطالعه بر اساس نتایج به‌دست‌آمده شواهدی مبنی بر نقش miR-31 در مهار متاستاز ارایه گردید.

نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان miR-31 که یک microRNA ضد متاستازی است در رده سلولی متاستاتیک MDA-MB231 در مقایسه با رده سرطانی ولی غیر متاستاتیک MCF-7 و رده سلولی نرمال MCF-10A به‌شدت کاهش می‌یابد. این رده سلولی از زیرگروه Claudin low بوده که بر اساس مطالعات انجام‌شده دارای درصد بالایی از سلول‌های CD44⁺CD24⁻ بوده و پلاستیسیته، فنوتیپ مهاجم، پتانسیل بالای متاستازی و خصوصیات شبه SC ای دارد و بیشترین مطالعات متاستاز سرطان پستان روی آن صورت گرفته است.^{۲۱،۲۰}

بازیافت بیان miR-31 بر روی رشد و تکثیر این سلول‌ها نقشی ندارد ولی روی مهاجرت و تهاجم سلولی اثر دارد. این miR توانایی مهار همزمان چند هدف متاستاتیک را داشته و در نتیجه قادر به مهار چندین مرحله از آبشار متاستاز می‌باشد. طبق گزارش‌های miR-31 با چنین عملکردی منجر به کاهش ۹۵٪ در متاستاز به ریه در یک مدل Orthotopic سرطان پستان گردیده است.^{۱۳} بر اساس نوع عملکرد miRNA و موقعیتش در بافت بیمار دو

بودن خصوصیت مهاجمی و مهاجرتی تاثیر چندانی نداشت. داده‌های به‌دست‌آمده از مطالعات درمانی نشان داده که miRNA ها به‌خصوص آنهایی که مرگ‌آورترین جنبه سرطان یعنی متاستاز را هدفگیری می‌کنند، می‌توانند تومور ساپرسورهای واجد شرایط یا (Bona fide) جهت درمان سرطان باشند. هر چند شکی درباره پتانسیل درمانی miRNA ها وجود ندارد چالش اصلی پژوهش‌ها بالفعل شدن این پتانسیل به شکل دارو است.^{۱۲}

miR31-mimic می‌تواند گزینه مناسبی جهت مهار متاستاز در سرطان سینه باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "مهار اختصاصی فرایند متاستاز در رده سلولی متاستاتیک MDA-MB231 حاوی Cancer stem cell با استفاده از توالی هدف خانواده miR-200 با همکاری ژن BRMS1 و miR-31 با عملکرد پلیوتروپیک در یک سازه کایمیریک" در مقطع دکترای تخصصی در سال ۱۳۹۳ می‌باشد که با حمایت دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

هر چند از کشف دارو تا رسیدن به بازار راه بسیار پر چالشی در پیش است رسیدن به مرحله اول آزمایشات بالینی نشان‌دهنده دارا بودن پتانسیل بالا در درمان برای یک داروست. اولین داروی miR-mimic هدفگیری‌کننده سرطان با اساس لیپوزومی یعنی miR-34 یا miR-mimic جهت بیماران دارای کارسینومای پیشرفته هیپاتوسلولار در آپریل ۲۰۱۳ وارد فاز اول آزمایشات بالینی گردیده است.^{۲۸}

با توجه به پتانسیل بالای روش‌های درمان بر اساس بازیافت miRNA، miR-31 که بیان آن در سلول‌های متاستاتیک پستان بیش از ۱۰۰ برابر نسبت به سلول نرمال کاهش می‌یابد انتخاب گردید و miR31-mimic در وکتور pcDNA 6.2gw/EmGFP که حاوی توالی ساختاری pre-miRNA 155 است که جهت انجام پردازش درست miR-31 لازم است قرار گرفت. نتایج حاصل از ترانسفکشن سازه درمانی گویای موثر بودن اثر این miR در کاهش خصوصیت مهاجمی رده سلولی MDA-MB231 بود در حالی که در MCF-7 به دلیل پایین

References

- Vaidya KS, Welch DR. Metastasis suppressors and their roles in breast carcinoma. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12(2-3):175-90.
- Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796(2):293-308.
- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006;12(8):895-904.
- Comen E, Norton L, Massague J. Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(6):369-77.
- Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 2007;369(9574):1742-57.
- Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;51:25-43.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522-31.
- Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res* 2009;69(19):7495-8.
- Edmonds MD, Hurst DR, Welch DR. Linking metastasis suppression with metastamir regulation. *Cell Cycle* 2009;8(17):2673-5.
- Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs: The micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):293-302.
- van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316(5824):575-9.
- 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.
- Valastyan S, Weinberg RA. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 2010;9(11):2124-9.
- Henry JC, Azevedo-Pouly AC, Schmittgen TD. MicroRNA replacement therapy for cancer. *Pharm Res* 2011;28(12):3030-42.
- Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(11):847-65.
- Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 6th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2007.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
- Hawly TS, Hawly GR, editors. Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
- Brooks SA, Schumacher U, editors. Metastasis Research Protocols, Vol. 1. Totowa, NJ: Humana Press; 2001.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009;69(4):1302-13.
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008;10(2):R25.
- Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther* 2011;18(12):1121-6.

23. McCormick F. Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):130-41.
24. Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6(1):55-61.
25. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834-8.
26. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007;39(5):673-7.
27. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010;70(18):7027-30.
28. Bouchie A. First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol* 2013;31(7):577.

Inhibition of breast cancer metastasis by using miR-31-mimic in cancer stem cell rich MDA-MB231 cell line

Abstract

Received: 17 Nov. 2014 Accepted: 02 Feb. 2015 Available online: 11 Mar. 2015

Samila Farokhmanesh Ph.D.¹
Mahdi Forouzandeh Moghadam
Ph.D.^{1*}
Marzieh Ebrahimi Ph.D.²

1- Department of Biotechnology,
Faculty of Medical Science, Tarbiat
Modares University, Tehran, Iran.
2- Department of Stem Cells and
Developmental Biology at Cell
Science Research Center, Royan
Institute for Stem Cell Biology and
Technology, ACECR, Tehran, Iran.

Background: Metastasis associated miRNA (metastamiR) opened a new field of anti-metastatic therapy which have a great potential of treatment for the most lethal aspect of cancer, metastasis. The pleiotropic nature of gene regulation exhibited by certain miRNAs that showed that miRNAs might be endowed with a capacity to function as crucial modulators of tumor metastasis. MiR-31 is a pleiotropic anti-metastatic miRNA whose expression decreased significantly in metastatic breast cancer cells. MiR-31 has multiple roles in metastasis cascade. Therefore, using the miR-31-restoration based therapy could be an efficient anti-metastatic strategy for cancer therapy.

Methods: This research was performed from May 2014 to October 2015 in Tarbiat Modares University in Tehran, Iran. The double-strand oligo of mature miR-31 was cloned into pcDNA 6.2gw/EmGFP according to the manufacturer instruction. The MDA-MB231, MCF-7 breast cancer cell lines were cultured and their miRNAs have been extracted. The expression of miR-31 has been quantified by Real time-PCR before transfection of construct contained miR-31 into two cell lines and in normal breast cells. Then the constructs contain miR-31 have been transfected in to two cell lines. The expression of miR-31 has been quantified after 48 hours. Scratch and invasion assay have been carried out for assessing the level of migration and invasion.

Results: The result of Real time-PCR before transfection of constructs contained miR-31 have been shown 4 fold and more than 100 fold reduction in expression of miR-31 in MCF-7 and MDA-MB231 respectively in comparison to miR-31 expression in normal breast cells, but after transfection of miR-31 construct to MDA-MB231 the quantification of expression showed the significant increase in mir-31 expression and 20 fold reduction in invasive and 10 fold reduction in migratory characteristics of MDA-MB231 in comparison to MCF-7.

Conclusion: Metastasis associated miRNA have been represented a promising candidates in the field of anti-metastatic therapy and miR-31 as a powerful member of this family can function very effectively in order to inhibit the metastasis and introduce the new possibility of metastasis inhibition.

Keywords: breast neoplasms, miR-31-mimic, neoplasm metastasis.

* Corresponding author: Department of Medical Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Jalal Al Ahmad Highway, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-82883861
E-mail: foroz@modares.ac.ir