



اثر جایگزینی miR-34a در مهار رشد رده سلول سرطانی مری

پروین مشقق: گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران

منصور آل طه: گروه زیست شناسی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران، و مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (*نویسنده مسئول).

manal239@yahoo.com

بهزاد برادران: مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

سرطان مری،

miRNA-34a

TE-8

ویمتنین

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۸/۱۱

زمینه و هدف: سرطان مری ششین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سرتاسر جهان به علت بد خیم بودن و پیش آگهی ضیف است. miR-34a یک سرکوبگر تومور می‌باشد. خانواده miRNA-34 در سرکوب کردن تومور و مسیرهای انکوژنی در برخی سرطان‌ها نقش دارد. منظور از این تحقیق این است که پس از جایگزین کردن miR-34a تغییرات بیان ژن Vimentin معین گردد و از طرفی تأثیر جایگزین کردن این میکرو RNA بر روی تکثیر سلولی مشخص گردد.

روش کار: بعد از کشته دادن رده سلولی miR-34a، TE-8 در سلول‌های سرطانی مری جایگزین شد و بعد از جایگزینی miR-34a بیان ژن Vimentin با روش qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. تکثیر سلولی در رده سلولی TE-8 در زمان و دوز مؤثر بعد از جایگزینی miR-34a با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: جایگزین کردن miR-34a در رده سلولی TE-8 موجب کاهش معنی داری در بیان ژن بیان ژن Vimentin شد ($p < 0.0001$). توانست (در دوز مؤثر بدبست آمده) در ۲۴ ساعت بطور چشمگیری تکثیر سلولی را کاهش دهد ($p < 0.0001$).

نتیجه‌گیری: احتمالاً جایگزینی miR-34a می‌تواند نقش درمانی در سرطان مری داشته باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Moshfegh P, Aletaha M, Baradaran B. The effect of miR-34a replacement in the proliferation inhibition of cancerous cell line of esophagus. Razi J Med Sci. 2019;26(9):29-38.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](#) صورت گرفته است.



Original Article

The effect of miR-34a replacement in the proliferation inhibition of cancerous cell line of esophagus

Parvin Moshfegh, Department of Biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran

Mansoor Aletaha, Department of Biology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran, & Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (* Corresponding author), manal239@yahoo.com

Behzad Baradaran, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Background: Because of its malignancy and poor prognosis, esophageal cancer is the sixth cause of death around the world. MiR-34a is a tumor suppressor. The miRNA-34 family is involved in suppressing the tumor and oncogenic pathways in some cancers. The purpose of this research is to determine the changes in the expression of the Vimentin gene after the replacement of miR-34a, on the other hand the effect of replacing this micro-RNA on cell proliferation is determined.

Methods: After cultivating the TE-8 cell line, miR-34a was replaced in esophageal cancer cells and after miR-34a replacement, *Vimentin* gene expression was evaluated using qRT-PCR method. Cell proliferation in the TE-8 cell line was evaluated in effective time and dose after the replacement of miR-34a by the MTT method.

Results: Replacing miR-34a in the TE-8 cell line significantly reduced the expression of *Vimentin* ($p<0.0001$). Mir-34a could (at an effective dose) within 24 hours significantly reduce cell proliferation ($p<0.0001$).

Conclusion: Possibly, the replacement of miR-34a could have a therapeutic role in esophageal cancer.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Esophageal cancer,
miRNA-34a,
TE-8,
Vimentin

Received: 22/06/2019

Accepted: 02/11/2019

Cite this article as:

Moshfegh P, Aletaha M, Baradaran B. The effect of miR-34a replacement in the proliferation inhibition of cancerous cell line of esophagus. Razi J Med Sci. 2019;26(9):29-38.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.



مقاله پژوهشی

مقدمه

های هدف برای القا تخریب آنها، از طریق جفت شدن ناقص با mRNA های هدف زن‌های کننده پروتئین تنظیم کند (۶).

خانواده miR-34 دارای میکروRNAهایی مانند miR-34a، 34b و miR-34c است که به عنوان میکروRNAهای سرکوب‌کننده تومور مطرح می‌باشند (۷). miR34a یک سرکوبگر تومور بسیار توانا می‌باشد (۸). مطالعات نشان داده است که خانواده miRNA-34 مستقیماً عملکردهای سرکوبگر توموری و مسیرهای انکوژنی را در برخی سرطان‌ها به هم مرتبط می‌سازد. miR-34a یکی از اهداف مستقیم پروآپوتوتیک رونویسی p53 است که می‌تواند در روند بیولوژیکی آن مداخله کند. بیان miR-34a به طور معمول در انواع مختلف از سرطان‌ها از جمله سرطان سینه، ریه، پانکراس و سرطان مثانه کاهش می‌یابد (۹). هدف از این مطالعه تعیین تأثیر جایگزینی miR-34a بر روی سطح بیان زن ویمنتین و تکثیر سلولی در رده سلولی سرطانی مری می‌باشد.

روش کار

کشت سلولی: محیط کشت استفاده شده در این مطالعه RPMI-1640 (Gibco, USA) می‌باشد که به شکل پودر بوده و حاوی ال گلوتامین و فاقد بی کربنات سدیم می‌باشد. این مطالعه بر روی رده‌های سلولی-TE-8 (RIKEN; Tsukuba, Ibaraki, Japan) انجام گرفت. رده سلولی TE-8 مربوط به آدنوکارسینومای مری با منشأ انسانی است. برای کشت این رده‌های سلولی از محیط کشت پایه RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco, USA) استفاده شد و در دمای ۳۷°C و ۵ درصد گاز دی اکسید کربن در شرایط رطوبت کافی انکوکنه گردید.

جایگزینی miR-34a در رده سلولی TE-8 برای پیدا کردن زمان و دوز مؤثر miR-34a: ابتدا سه پلیت ۶ خانه‌ای، یکی برای تایم ۲۴ ساعت دیگری برای تایم ۴۸ ساعت انتخاب شد. از سه دوز ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ نانومول از میکرو RNA استفاده شد. آزمایش به صورت تریپلیکت

سرطان به عنوان یکی از علل عمدۀ مرگ و میر در جهان شناخته می‌شود به طوری که گفته می‌شود در کشورهای پیشرفته بروز سرطان‌ها در حال تجاوز از بیماری‌های قلبی-عروقی می‌باشد. پیش‌بینی می‌شود که در سال ۲۰۳۰ سرطان، اولین و مهم‌ترین علت مرگ انسان گردد (۱).

سرطان مری هشتمین سرطان شایع و ششمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان است (۲). کارسینوم سلول سنگفرشی مری (ESCC) و آدنوکارسینومای مری (EAC) دو زیرتیپ هیستوپاتولوژیکی اصلی سرطان مری است که در سلول‌های سنگفرشی مری ایجاد می‌شود در حالی که در سلول‌های سرطانی حاوی اپیتلیوم روده‌ای EAC، در سلول‌های Barrett's esophagus (Barrett's esophagus) شناخته می‌شود. هر دو تیپ دارای ویژگی‌های مختلف اتیولوژیکی و پاتولوژیکی مانند تفاوت در توسعه، سبب‌شناسی و درمان هستند. علیرغم توسعه روش‌های تشخیصی و انواع درمان‌ها، با توجه به این که در بیشتر بیماران در زمان تشخیص بیماری به اطراف متاستاز داده است پیش‌آگهی این بیماری بسیار ضعیف بوده، و میزان بقاء ۵ ساله آن حدود ۱۰٪ است (۳). بنابراین شناسایی مارکرهای بیولوژیکی برای بهبود تشخیص زودهنگام و ایجاد استراتژی‌های جدید درمان برای مبارزه با بیماری بسیار مهم می‌باشد.

میکروRNAها نوعی از مولکول‌های RNA اخیراً کشف شده کوتاه، غیرکدکننده و اندوژن هستند که تنها ۱۹-۲۵ نوکلئوتید طول دارند. از زمان کشف آن‌ها در سال ۱۹۹۳ تاکنون، نشان داده شده است که این مولکول‌های کوچک در تنظیم طیف گسترده‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند چرخه سلولی، تمایز، آپوپتوز و تکامل دخالت دارند. بنابراین کشف نقش آن‌ها در فرآیندهای پاتولوژیکی مثل سرطان تعجب‌آور نیست (۴، ۵). miRNA می‌تواند بیان زن‌های سلولی را در سطح رونویسی یا پس از رونویسی با سرکوب ترجمه زن‌های کد کننده پروتئین و یا با شکستن miRNA

Trypsin/EDTA ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از جدا شدن سلول‌ها جهت خنثی کردن Trypsin/EDTA، ۳ میلی لیتر محیط کشت حاوی FBS به سلول‌ها اضافه شد سپس سلول‌ها به فالکون منتقل گشته و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از شستشوی سلول‌ها، مایع رویی را خارج نموده و به رسوب سلولی یک میلی لیتر GeneAll، Republic of Korea) RibotEx سلولی اضافه شد و بعد از ورتكس کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merck, Germany) اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. سپس در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. فاز آبی را برداشته و هم حجم آن ایزوپروپانول (Merck, Germany) اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوباسیون انجام گرفت. بعد از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به رسوب یک میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه کرده و سانتریفیوژ گردید. میکروتیوب حاوی RNA با درب باز در زیر هود قرار داده شد تا کاملا خشک گردد. سرانجام رسوب داخل میکروتیوب را در ۲۰ میکرو لیتر EXIQON, Denmark Nuclease در Free Water درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه میکروتیوب را در دستگاه pass Dray قرار داده شد و سپس برای نگهداری، مستقیماً به ۸۰-انتقال داده شد.

cDNA: برای تهیه cDNA از کیت تجاری EXIQON (EXIQON, Denmark) استفاده گردید. در ابتدا غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودرآپ (ThermoScientific, 2000c, USA) اندازه گیری شد. طبق پروتکل شرکت EXIQON برای سنتز RNA به مقدار $5\text{ }\mu\text{l}$ از cDNA به مقدار 5 ng از استخراج شده نیاز می‌باشد. بعد از محاسبه مقدار RNA مورد نیاز از روی غلظت RNA برای هر نمونه، RNA با محلول Nuclease Free Water (EXIQON, Denmark) به ۵۰۰ میکرو لیتر رسانده شد و سپس به آن‌ها ۱ میکرولیتر Enzyme mix (EXIQON, Denmark) و ۲

انجام گرفت. برای انجام آزمایش در هر چاهک 2×10^5 TE-8 سلول توزیع گردید و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری گردیدند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه نمودن سلول‌ها، آن‌ها را شستشو داده و سپس به هر چاهک ۲ میلی لیتر از محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک و بدون سرم جنینی گاو (FBS) افروده شد و به مدت یک ساعت پلیت در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن انکوبه گردید.

به ازای هر چاهک دو میکروتیوب برداشته و در یکی از میکروتیوب‌ها ۶ میکرولیتر miR-34a (Genomics, USA) با ۹۴ میکرولیتر محیط ترانسفکشن (Santacruz biotechnology California, USA) ریخته و در میکروتیوب دیگر ۶ میکرولیتر معرف مخصوص ترانسفکت (Transfection reagent) (Santacruz biotechnology California, USA) با ۹۴ میکرولیتر محیط ترانسفکشن مخلوط کرده و بعد از آماده کردن این دو میکروتیوب، محتوای هر دو میکروتیوب را باهم مخلوط کرده و سرانجام محلول بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. لازم به توضیح است که معرف مخصوص ترانسفکت (Transfection reagent) با این نام و فرمول محترمانه برای شرکت سازنده ارایه می‌شود که موجب انتقال میکرو RNA از دیواره سلولی به داخل سلول می‌شود.

در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از محلول مخلوط شده که در بالا ذکر شد را به هر ول اضافه کرده و پلیت به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن انکوبه گردید. پس از اتمام ۶ ساعت انکوباسیون به هر چاهک از پلیت، ۱ میکرو لیتر از محیط RPMI1640 که حاوی آنتی‌بیوتیک و ۲۰٪ سرم جنین گاوی افزوده شد.

استخراج RNA و میکرو RNA به روش RNA کل: از سلول‌های ترانسفکت شده و همچنین غیر ترانسفکت شده با میکرو RNA (کنترل) رسوب سلولی تهیه شد به منظور تهیه رسوب سلولی ابتدا مایع رویی پلیت‌های ۶ خانه خارج شد سپس سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شدند و حدود یک میلی لیتر محلول 25 ml درصد

دستگاه (Roche, Germany) Light Cycle96 (Roche, Germany) Light Cycle96 انجام شد. نسبت بیان ژن ها از طریق روش $\Delta\Delta CT$ ² محاسبه گردید، از β -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱).

به عنوان بلانک تیوبی که حاوی تمام مواد موجود در واکنش به جزء cDNA بود، مورد استفاده قرار گرفت و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC Water اضافه شد. همه مراحل بر روی یخ انجام شده و جهت جلوگیری از آبودگی در زیر هود لامینار انجام گرفت. بررسی پرولیفراسیون سلولی با روش MTT ۲۰۰: میکرولیتر از سوسپانسیون سلول TE-8 که حاوی 15×10^6 سلول بود در هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه ای پخش گردید. پلیت را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد تا سلول ها به کف پلیت متصل شوند. در مرحله بعد سلول ها به صورت تریپلیکت (سه بار) با استفاده از miR-34a در غلظت های ۵، ۲۵ و ۱۰۰ نانومول در زمان های ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، محیط کشت داخل چاهک ها خارج شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به همراه ۵ میکرولیتر محلول (Bio Basic, Canada) (۲ mg/ml) MTT (۲ mg/ml) MTT (AppliChem, Germany) DMSO (AppliChem, Germany) و میکرولیتر از بافر سورنسون به هر چاهک اضافه شد. پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در جای تاریک انکوبه شدند. جذب پلیت ها توسط دستگاه الایزاریدر (Tecan, Sunrise, Austria) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید.

آنالیز آماری: در این تحقیق تمام آزمایشات به صورت

میکرو لیتر (EXIQON, ۵x reaction buffer Denmark) اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن این ترکیبات با هم به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر (BioRad, T100 Thermal Cycle, USA) و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سرانجام نمونه ها در -۲۰ درجه سانتی گراد برای مدت کوتاه و در -۸۰ درجه سانتی گراد برای مدت طولانی ذخیره و نگهداری گردید. مطابق با پروتکل به نسبت ۱ به ۸۰ رقیق شده و ۴ میکرولیتر از این cDNA های رقیق شده با ۵ میکرولیتر SYBR Green dNTP و مستر میکس که شامل (Roche, Germany) Light Cycle96 (جدول ۱) و در دستگاه (EXIQON, Denmark) Primer mix (Roche, Germany) Light Cycle96 (جدول ۱) با برنامه ۱۰ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و ۷ دقیقه در دمای ۷۲ Ramp درجه سانتی گراد طی ۴۵ سیکل در ۱/۶ ثانیه (EXIQON, Denmark) SNORD47 قرار داده شد. از به عنوان کنترل داخلی برای میکرو RNA استفاده گردیده شد (جدول ۱).

Real-Time PCR برای بررسی بیان ژن ویمنتین (Vimentin) در یک سیستم واکنشی با حجم Syber Green ۱۰ μ l از ۲۰ میکرولیتر که شامل 0.3μ l PCR Master Mix 2X 0.3μ l پرایمر فوروارد، 0.3μ l پرایمر ریورز (جدول ۱)، 1μ l از ۲۰ ng cDNA و $8/4$ DEPC بود در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و در ۴۵ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱۰ ثانیه و ۵۹ درجه سانتی گراد برای ۴۰ ثانیه در

جدول ۱ - توالی پرایمرهای و توالی میکروRNAها

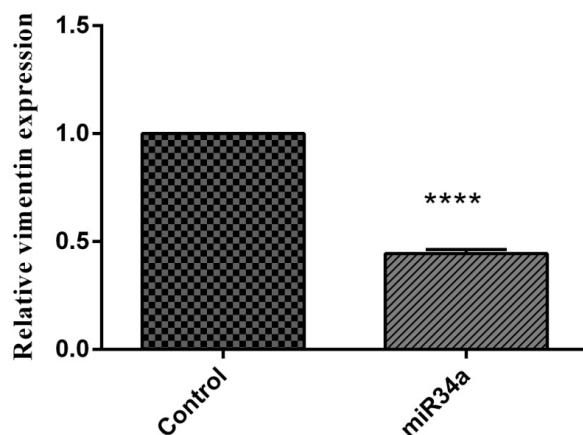
Name		Sequence
<i>Vimentin</i>	Forward	5'-GCGCACAAATCCCTTCTACC-3'
	Revers	5'-ATCCGTGTAGCACATTCTGTCC-3'
<i>Beta-actin</i>	Forward	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'
	Revers	5'-GTAGTTCTGGATGCCACA-3'
miR-34a	Target sequence	5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGAACAUAGAACAUAGAAGGUUU
SNORD47	Target sequence	5'-CCUGGAUGAUGAUAGCAAAUGCUGACUGAACAUAGAACAUAGACU-3'

سلول‌های TE-8 سرطان مری: بعد از جایگزینی miR-34a در رده سلولی سرطان مری، توسط qRT-PCR بیان نسبی ژن *vimentin* مورد بررسی قرار گرفت. هر کدام از نمونه‌ها نسبت به ژن کنترل داخلی بتا-اکتین مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های جایگزین شده با miR-34a با سلول‌های جایگزین نشده با miR-34a (به عنوان کنترل) مورد ارزیابی قرار گرفتند که در نهایت نشان داده شد که جایگزینی miR-34a موجب کاهش چشمگیری در بیان ژن *vimentin* می‌شود ($p<0.0001$) (نمودار ۱). از آنجایی که *vimentin* در روند متاستازیس سرطان نقش ایفا می‌کند بنابراین می‌توان اظهار نظر کرد که miR-34a می‌تواند روند متاستازی بودن سرطان مری را از این طریق کاهش دهد. لازم به ذکر است که سطح بیان ژن بتا-اکتین به

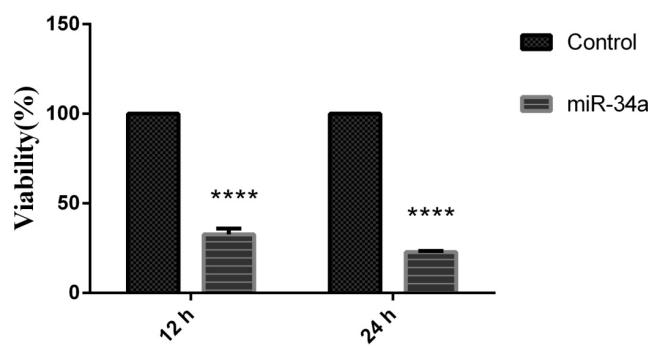
سه بار تکرار انجام گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرمافزار ۶ Prism صورت گرفت، شاخص‌های مرکزی شامل میانگین و انحراف معیار توسط آمار توصیفی بدست آمد. برای مقایسه گروه‌ها از آزمون آماری t Student استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p<0.05$ نظر گرفته شد.

یافته‌ها

قبل از شروع آزمایشات، زمان و дوز مؤثر جایگزینی miR-34a بر روی سلول‌های TE-8 بدست آمد، و از سه дوز ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ نانومول و زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. در زمان ۲۴ ساعت و дوز ۱۰۰ نانومول بیشترین بیان را miR-34a تعیین اثر miR-34a بر روی بیان ژن *vimentin* در



نمودار ۱- سطح بیان ژن *Vimentin* بعد از جایگزینی miR-34a در سلول‌های سرطانی مری. سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ نانومول از miR-34a جایگزین شده و بعد از ۲۴ ساعت از جایگزین کردن، کل RNA سلول استخراج شده و سطح بیان نسبی mRNA در مقایسه با بتا-اکتین (کنترل داخلی) بوسیله qRT-PCR مورد آزمایش قرار گرفت. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شدند. *** $p<0.0001$ در مقابل کنترل می‌باشد.



نمودار ۲- تأثیر جایگزینی miR-34a بر روی تکثیر سلولی در رده سلولی TE-8 سرطان مری. ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از جایگزینی miR-34a با غلظت ۱۰۰ نانومول، آزمایش MTT برای تکثیر سلول‌ها انجام گرفت. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده اند. *** $p<0.0001$ در مقابل کنترل می‌باشد.

پتانسیل فراوانی برای بررسی میکروRNAها به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی حساس در بسیاری از بیماری ها وجود دارد (۱۷).

Kerscher و همکاران برای اولین بار ثابت کردند که بازگرداندن سطح بیان Let-7 در سرطان ریه عملکرد تومورسپرسوری دارد و همچنین نشان دادند که Let-7 می‌تواند یک پتانسیل درمانی در درمان سرطان ریه باشد (۱۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد تکنیک بازگردانی بیان miRNA های تومورسپرسور در سرطان، می‌تواند عنوان یک هدف درمانی باشد (۱۸، ۱۹).

miRNA های تغییر بیان یافته منجر به تومورزایی می‌شوند اما در مورد نقش miRNA ها در سرطان مری شناخت کمی وجود دارد. بنابراین لازم است به منظور روشن سازی مکانیسم دقیق سرطانزایی OSCC (Oral squamous cell carcinoma) در مورد ژن‌های هدف miRNA های خاص در OSCC مطالعه و تحقیق انجام شود. ژن‌های هدف این miRNA ها ممکن است ژن‌های سرکوب‌کننده تومور یا سایر ژن‌های مرتبط با انکوژن‌ها باشند مانند فاکتورهای رشد، گیرنده‌های فاکتور رشد، مبدل‌های سیگنال (Signal transducer)، فاکتورهای رونویسی، تنظیم کننده‌های مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز)، ژن‌هایی که تقسیم سلولی را کنترل می‌کنند، یا ژن‌هایی که DNA را ترمیم می‌کنند (۲۰).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که سطح بیان ژن Vimentin بعد از جایگزینی miR-34a در سلول‌های سرطانی مری با روش qRT-PCR کاهش چشمگیری نشان داد ($P < 0.0001$). از آنجایی که vimentin می‌تواند روند متاستازیس سرطان نقش ایفا می‌کند (۲۱) بنابراین می‌توان اظهار نظر کرد که miR-34a می‌تواند گاهی این روند را از این طریق کاهش دهد. تعیین میزان تکثیر سلولی در رده سلولی TE-8 در زمان و دوز مؤثر توسط miR-34a با روش MTT انجام شد که جایگزینی miR-34a توانست در دوز مؤثر بدست آمده در ۲۴ ساعت بطور چشمگیری تکثیر سلولی را کاهش دهد ($P < 0.0001$).

گالاردو و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه خود miR-34a را به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی جدید در

عنوان کنترل داخلی در تمام گروه‌ها یکسان بوده است ($p > 0.05$).

تعیین میزان تکثیر سلولی در رده سلولی TE-8 پس از جایگزینی miR-34a : تکثیر سلولی بعد از جایگزینی miR-34a مورد ارزیابی قرار گرفت که برای اینکار از آزمایش MTT استفاده شد. نتایج نشان داد که miR-34a توانست در دوز مؤثر بدست آمده در ۲۴ ساعت بطور چشمگیری ($P < 0.0001$) تکثیر سلولی را کاهش دهد (نمودار ۲). p کمتر از 0.05 به عنوان رابطه معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان از بیماری‌های بدخیم مزمن و غیر واگیردار است که به عنوان یک معضل بهداشتی و تاثیر گذار بر سلامت جامعه محسوب می‌گردد (۱۰). سرطان یک مشکل بزرگ برای سلامت همه جوامع بشری است. هم چنین سرطان بیماری متنوعی در سطوح بافتی، توموری و سلولی است و این گوناگونی اصلی ترین چالش در تشخیص اختصاصی بوده و به تبع آن درمان‌های غیر اختصاصی و نامناسب را موجب می‌شود (۱۱، ۱۲). از این رو مطالعات گستردۀ در زمینه تشخیص اختصاصی و درمان مناسب در سرطان امری حیاتی است. روش‌های عملی و رایج درمان سرطان شامل جراحی، پرتو درمانی، شیمی درمانی، ژن درمانی، استفاده از داروهای ضد رگ زایی ایمنوتراپی، دارورسانی هدفمند و هایپرترمیا می‌باشد (۱۳).

miRNA ها گروهی از RNA های حفاظت شده تک رشته‌ای کوتاه (بطول ۱۹-۲۲ نوکلئوتید) و غیر کد کننده هستند که به عنوان تنظیم کننده‌های بعد از رونویسی بیان ژن، در گستره‌ی وسیعی از حیوانات، گیاهان و ویروس‌ها، عمل می‌کنند و در پدیده‌های زیستی نقش حیاتی ایفا می‌کنند (۱۴). بیش از ۳۰۰ miRNA در بدن مشخص شده اند که وظیفه‌ی تنظیم حدود ۳۰ ژن در بدن از رشد و نمو تا انواع بیماری‌ها را دارند. در نتیجه این مولکول‌ها تنظیم کننده‌های مهمی در بدن هستند (۱۵، ۱۶). همچنین میکروRNAها مولکول‌های پایداری در مایعات بیولوژیک بدن هستند و بسیاری از این مایعات همانند بزاق، ادرار و سرم به راحتی و با کمترین خطر در دسترس می‌باشند، بنابراین

پیشرفت و پیش‌آگهی ESCC است (۲۶).

بسیاری از مدل‌های موشی نشان داده اند که افزایش miR-34 منجر به کاهش اندازه تومور بدون عوارض جانبی می‌شود، اما انتقال miR کاری دشوار است (۲۷).

تمام این مطالعات انجام شده از نظر اینکه کاهش بیان miR-34a موجب پیشرفت سرطان و ایجاد سرطان می‌شود با این مطالعه هم خوانی دارد ولی مطالعه‌ای که بتواند جایگزینی miR-34a را در سلول‌های سرطانی نشان دهد وجود نداشت.

ژن ویمنتین (Vimentin) یک مارکر مزانشیمی کدکننده پلی پیتید ۴۶۶ آمینو اسیدی (۵۳kDa)، پروتئین بسیار محافظت شده متعلق به خانواده فلامنت های حد وسط نوع III بیان شونده در سلولهای مزانشیمی است (۲۸) و نشان دهنده یکی از تقریباً ۴۰ عضو خانواده چندزنی فیلامنت های حد وسط است و نقش اثبات شده ای در فرآیند تبدیل سلولهای اپیتلیالی به مزانشیمی (EMT) دارد. ویمنتین یک پروتئین چند منظوره است و توانایی آن در تعامل با تعداد زیادی از پروتئین‌ها، آن را یک تنظیم کننده بالقوه عملکردی‌های فیزیولوژیک مختلف می‌کند (۲۸). این پروتئین مسئول حفظ شکل سلول، یکپارچگی سیتوپلاسم، تثبیت تعاملات اسکلت سلولی و درگیر در پاسخ ایمنی است و به عنوان سازمان دهنده تعدادی از پروتئین‌های حیاتی درگیر در اتصالات، مهاجرت و سیگنانلینگ سلولی عمل می‌کند. ویمنتین در طول رشد جنبی و عمده در مرحله شیار اولیه (Primitive streak stage) بیان می‌شود، در حالی که بیان آن محدود به سلول‌های مزانشیمی بافت همبند، CNS و عضلات در بزرگسالان است (۲۸). بسیاری از مطالعات و تحقیقات گزارش داده اند که در اکثر سرطان‌ها، بیان ژن ویمنتین و فیبرونکتین تغییر یافته است و نشان دهنده ارتباط بین بیان آن‌ها و بدخیمی سرطان است (۲۹، ۲۱). افزایش بیان ویمنتین در چندین سرطان نوع اپیتلیالی گزارش شده است. افزایش بیان ویمنتین در سرطان با افزایش رشد تومور، تهاجم و پیش‌آگهی بد مرتبه است. در این مطالعه نشان داده شد که جایگزینی miR-34a در سلول‌های سرطانی مری باعث کاهش بیان ژن ویمنتین می‌شود بنابراین جایگزینی miR-34a در سلول‌های

بیماران مبتلا به سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) شناسایی کرده اند، که روش بالقوه ای برای برآورد خطر عود مجدد بیماری فراهم می‌کند و یک ابزار مفید برای کمک به تصمیم گیری در مورد درمان می‌باشد (۲۲).

در سال ۲۰۱۳ گائو و همکاران دریافتند که سطوح بیان miR-34a با درجه WHO، گلیوما ارتباط مثبت دارد. علاوه بر این، در بیماران مبتلا به گلیوما درجه III و IV، بیان پایین miR-34a با بدتر شدن بقای progression-free و بقا کلی overall survival ارتباط دارد. آنالیز تک متغیره و چند متغیره نشان داد که miR-34a یک نشانگر پیش‌آگهی مستقل برای گلیوما بود. بنابراین بیان miR-34a امری جدید و بالقوه مفید، برای پیش‌بینی پیش‌آگهی گلیوما می‌باشد (۲۳).

در مطالعه‌ای که توسط جین و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، مشاهده گردید که بیان miR-34a در بافت‌های آدنوکارسینومای کیسه صfra در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد و بطور قابل توجهی با پیش‌آگهی ضعیف بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای کیسه صfra ارتباط دارد (۲۴).

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که میزان بیان miR-34a به طور چشمگیری در بافت سرطان معده در مقایسه با بافت نرم‌مال مجاور کاهش یافته است. علاوه بر این، بیان پایین miR-34a با درگیری گره‌های لنفاوی، مرحله پیشرفته، تمایز تومور و میزان بالای عود مجدد تومور ارتباط دارد. بنابراین نتایج به دست آمده، نشان داد که بیان کاهشی-34a در سرطان معده با عود مجدد بالا ارتباط دارد و miR-34a ممکن است به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی برای سرطان معده بکار برود (۲۵).

مطالعه لین و همکاران نشان داد که سطوح بیان esophageal squamous-cell (ESCC) در miR-34a (carcinoma miR-34a در ESCC به طور قابل توجهی در مقایسه با بافت miR-34a در ESCC به طور قابل توجهی با تمایز تومور، وضعیت گره لنفاوی و مرحله بالینی پیشرفته مرتبه است. بنابراین بررسی یافته‌های مطالعه آن‌ها نشان می‌دهد که بیان miR-34a در ESCC انسانی کاهش یافته و نشان دهنده نقش مهم کاهش بیان miR-34a در

- Breast Cancer: A preventable disease. *j birjand univ med sci.* 2014;21(2):126-41.
11. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 2013;501(7467):328-37.
12. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer.* 2013;108(3):479-85.
13. Arruebo M, Vilaboa N, Sáez-Gutiérrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, González-Fernández Á. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers (Basel).* 2011;3(3):3279-3330.
14. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
15. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer lett.* 2009;285(2):116-26.
16. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2014;15(8):509-24.
17. Khoshnirsafa M, Seif F, Mohsenzadegan M, Najafi M, Mokhtarian K, Shekarabi M. Circulating microRNAs, valuable biomarkers in biological fluids. *RJMS.* 2017;24(160):22-36.
18. Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, et al. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell cycle.* 2008;7(6):759-64.
19. Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, et al. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene.* 2010;29(11):1580.
20. Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68(1):26-33.
21. McInroy L, Määttä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360(1):109-14.
22. Gallardo E, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30(11):1903-9.
23. Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. *J Neurooncol.* 2013;113(2):221-8.
24. Jin K, Xiang Y, Tang J, Wu G, Li J, Xiao H, et al. miR-34 is associated with poor prognosis of patients with gallbladder cancer through regulating telomere length in tumor stem cells. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1503-10.
25. Zhang H, Li S, Yang J, Liu S, Gong X, Yu X. The prognostic value of miR-34a expression in completely resected gastric cancer: tumor recurrence and overall survival. *Int J Clin Exp Med.*

سرطانی مری می‌تواند نقش مهاری در روند ایجاد سرطان از طریق کاهش بیان ژن ویمتنین داشته باشد. درمان‌های متداول امروزی از جمله شیمی درمانی و جراحی تأثیر چشمگیری بر روی سرطان مری متاستاتیک ندارند و تمام تلاش بشر براین هست که با هدف درمانی و ژن درمانی بتواند این سرطان را مهار کند. از طرفی تشخیص سریع سرطان نیز یکی دیگر از دغدغه‌های علم امروزی می‌باشد که تلاش فراوانی صورت می‌گیرد که مارکرهای شناسایی کنند که توسط افزایش یا کاهش بیان این مارکرها در بدن بتواند سریعاً سرطان مری را شناسایی کنند. در این مطالعه نشان داده شد که miR-34a احتمالاً می‌تواند نقش درمانی و همچنین نقش مارکری برای تشخیص سرطان مری داشته باشد.

تقدیر و تشکر

از کارشناسان مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تشکر و سپاسگزاری کرده که در انجام این طرح از هیچ کمکی و راهنمایی دریغ ننمودند.

References

1. Radmard AR. Five common cancers in Iran. *Arch Iran Med.* 2010;13(2):143.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.
3. Song Y, Li L, Ou Y, Gao Z, Li E, Li X, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature.* 2014;509(7498):91-5.
4. Zhang R, Su B. Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3' UTR evolution. *JGG.* 2009;36(1):1-6.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350.
6. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Bba-Mol Cell Res.* 2010;1803(11):1231-43.
7. Wang A-M, Huang T-T, Hsu K-W, Huang K-H, Fang W-L, Yang M-H, et al. Yin Yang 1 is a target of microRNA-34 family and contributes to gastric carcinogenesis. *Oncotarget.* 2014;5(13):5002.
8. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2010;17(2):193.
9. Bader AG. miR-34—a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet.* 2012;3.
10. Tahergorabi Z, Moodi M, Mesbahzadeh B.

- 2015;8(2):2635.
26. Lin X, Xu X, Chen Q, Huang C. Clinical significance of microRNA-34a in esophageal squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res.* 2015;14:17684-91.
 27. Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT, et al. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(8):1470-80.
 28. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(18):3033-46.
 29. Ngan C, Yamamoto H, Seshimo I, Tsujino T, Man-i M, Ikeda J, et al. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2007;96(6):986-92.