مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۹، آذر ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

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

پروین مشفق: 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

زمینه و هدف: سرطان مری ششمین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در سرتاسر جهان به علت بدخیم بودن و پیش آگهی ضعیف 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 معیین گردد و از طرفی تأثیر جایگزین کردن این میکروRNA بر روی تکثیر سلولی مشخص گردد.

روش کار: بعد از کشت دادن رده سلولی TE-8، miR-34a 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 ($p < ۰/۰۰۰۱$). mir-34a توانست (در دوز مؤثر بدست آمده) در ۲۴ ساعت بطور چشمگیری تکثیر سلولی را کاهش دهد ($p < ۰/۰۰۰۱$).

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

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

سرطان مری،
miRNA-34a،
TE-8،
ویمنتین

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۰۱
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۱۱

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 به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

Razi Journal of Medical Sciences.2019;26(9):29-38. http://rjms.iums.ac.ir

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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

مقدمه

سرطان به عنوان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان شناخته می‌شود به‌طوری‌که 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 ESCC، در سلول‌های سنگفرشی مری ایجاد می شود درحالی‌که EAC، در سلول‌های سرطانی حاوی اپیتلیوم روده‌ای رشد می‌کند که همچنین به عنوان مری بارت (Barrett's esophagus) شناخته می شود. 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 این‌که 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٪ درصد 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 ۲۵-۱۹ نوکلئوتید طول دارند. از زمان کشف آن‌ها در سال ۱۹۹۳تاکنون، 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 ژن‌های سلولی را در سطح رونویسی یا پس از رونویسی با سرکوب ترجمه ژن‌های کد کننده پروتئین و یا با شکستن miRNA های هدف برای القا تخریب آن‌ها، از طریق جفت شدن ناقص با mRNA های هدف ژن‌های کننده پروتئین تنظیم کند (۶).

خانواده miR-34 دارای میکروRNAهایی مانند miR-34a، miR-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 پروآپوپتوتیک 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 ژن 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 انکوبه 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 میکروRNA استفاده شد. آزمایش به صورت تریپلیکت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

انجـام گرفـت. بـرای انجـام آزمـایش در هـر چاهـک $10^5 \times 2$سلول TE-8 توزیع گردید و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک انکوباتور با دمای ۳۷ درجـه سـانتی‌گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن نگهداری گردیدنـد. پـس از ۲۴ سـاعت انکوبـه نمـودن سـلول‌هـا، آن‌هـا را شستشـو داده و سـپس بـه هـر چاهـک ۲ میلی‌لیتـر از محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک و بـدون سـرم جنینـی گاو (FBS) افزوده شد و به مدت یک سـاعت پلیـت در ۳۷ درجـه سـانتی‌گراد، ۹۵٪ رطوبـت و ۵٪ دی‌اکسـید کربن انکوبه گردید.

به ازای هر چاهک دو میکروتیوب برداشته و در یکـی از میکروتیوپ‌ها ۶ میکرولیتـر miR-34a (SwitchGear Genomics, USA) با ۹۴ میکرولیتر محیط ترانسفکشن (Santacruz biotechnology California, USA) ریختـه و در میکروتیـوب دیگـر ۶ میکرولیتـر معـرف مخصـوص ترانسـفکت (Transfection reagent) (Santacruz biotechnology California, USA) با ۹۴ میکرولیتر محیط ترانسفکشـن مخلـوط کـرده و بعـد از آمـاده کـردن ایـن دو میکروتیـوب، محتـوای هـر دو میکروتیوب را باهم مخلـوط کـرده و سـرانجام محلـول بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقـه در دمـای اتـاق انکوبـه گردیـد. لازم بـه توضـیح اسـت کـه معـرف مخصـوص ترانسفکت (Transfection reagent) با این نام و فرمول محرمانه برای شرکت سازنده ارایه می شود کـه موجـب انتقال میکروRNA از دیـواره سـلولی بـه داخـل سـلول می‌شود.

در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از محلول مخلوط شده کـه در بالا ذکر شد را به هر ول اضافه کرده و پلیت به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه گردید. پس از اتمام ۶ ساعت انکوباسیون به هـر چاهـک از پلیـت، ۱ میکـرو لیتـر از محیط RPMI1640 که حاوی آنتی‌بیوتیک و ۲۰٪ سرم جنین گاوی افزوده شد.

استخراج RNA و میکروRNA به روش RNA کـل: از سلول‌های ترانسفکت شده و همچنـین غیـر ترانسـفکت شده با میکرو RNA (کنترل) رسوب سلولی تهیه شد به منظور تهیه رسوب سلولی ابتدا مایع رویی پلیت های ۶ خانه خارج شد سپس سلول ها با محلول PBS شستشو داده شدند و حدود یک میلی‌لیتر محلـول ۰/۲۵ درصـد Trypsin/EDTA به فلاسک ها اضافه شد و به مدت ۵-۳ دقیقه در انکوبـاتور ۳۷ درجـه سـانتی‌گراد قـرار داده شدند. بعد از جدا شدن سلول ها جهـت خنثـی کـردن Trypsin/EDTA، ۳ میلی‌لیتـر محـیط کشـت حـاوی FBS به سلول ها اضافه شد سپس سلول ها به فـالکون منتقل گشته و در دور ۱۵۰۰ rpm به مـدت ۱۰ دقیقـه سانتریفوژ گردید. بعد از شستشوی سلول ها، مایع رویی را خـارج نمـوده و بـه رسـوب سـلولی یـک میلی‌لیتـر RiboEx (GeneAll, Republic of Korea) به رسـوب سلولی اضافه شد و بعد از ورتکـس کـردن بـه مـدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در مرحلـه بعـد ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم (Merck, Germany) اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شـد. سـپس در دور ۱۲۰۰۰rpm بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در دمـای ۴ درجـه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. فاز آبی را برداشـته و هـم حجم آن ایزوپروپانول (Merck, Germany) اضافه شـد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سـانتی‌گراد انکوباسـیون انجـام گرفـت. بعـد از سـانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در دمـای ۴ درجـه سانتی‌گراد به رسوب یـک میلی‌لیتـر اتـانول ۷۵ درصـد سرد اضافه کرده و سانتریفوژ گردید. میکرتیـوب حـاوی رسوب RNA با درب باز در زیر هـود قـرار داده شـد تـا کاملا خشک گردد. سرانجام رسوب داخل میکروتیوب را در ۲۰ میکرو لیتر Nuclease (EXIQON, Denmark) Free Water، بـه خـوبی حـل نمـوده و سـپس در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقـه میکروتیـوب را در دسـتگاه Dray pass قـرار داده شـد و سـپس بـرای نگهداری، مستقیماً به ۸۰- انتقال داده شد.

سـنتز cDNA: بـرای تهیـه cDNA از کیـت تجـاری EXIQON (EXIQON, Denmark) استفاده گردید. در ابتـدا غلظـت RNA اسـتخراج شـده توسـط دسـتگاه نـانودراپ (ThermoScientific, 2000c, USA) انـدازه گیری شد. طبق پروتکل شرکت EXIQON برای سـنتز cDNA به مقدار ۵ ng/µl از RNA استخراج شـده نیـاز می‌باشد. بعد از محاسبه مقدار RNA مورد نیـاز از روی غلظـت RNA بـرای هـر نمونـه، RNA بـا محلـول Nuclease Free Water (EXIQON, Denmark) بـه حجم ۵۰۰ میکرو لیتر رسانده شد و سپس بـه آن‌هـا ۱ میکرولیتر Enzyme mix (EXIQON, Denmark) و ۲

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

میکرو لیتر 5x reaction buffer (EXIQON, Denmark) اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن این ترکیبات با هم به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر (BioRad, T100 Thermal Cycle, USA) و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سرانجام نمونه ها در ۲۰- درجه سانتیگراد برای مدت کوتاه و در ۸۰- درجه سانتیگراد برای مدت طولانی ذخیره و نگهداری گردید.

qRT-PCR miRNA Gene: cDNA های سنتز شده مطابق با پروتکل به نسبت ۱ به ۸۰ رقیق شده و ۴ میکرولیتر از این cDNAهای رقیق شده با ۵ میکرولیتر مسترمیکس که شامل dNTP و SYBR Green (EXIQON, Denmark) می‌باشد مخلوط شده و به هر کدام از میکروتیوب ها ۱ میکرولیتر hsa-miRNA-34a Primer mix (EXIQON, Denmark) اضافه کرده (جدول ۱) و در دستگاه Light Cycle96 (Roche, Germany) با برنامه ۱۰ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد طی ۴۵ سیکل در ۱/۶ ثانیه Ramp قرار داده شد. از SNORD47 (EXIQON, Denmark) به عنوان کنترل داخلی برای میکروRNA استفاده گردیده شد (جدول ۱).

Real-Time PCR برای بررسی بیان ژن ویمنتین (Vimentin): PCR در یک سیستم واکنشی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که شامل ۱۰ µl از Syber Green PCR Master Mix 2X، ۰/۳µl پرایمر فوروارد، ۰/۳µl پرایمر ریورز (جدول ۱)، ۱µl از cDNA (۲۰ng) و ۸/۴ µl DEPC بود در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ۴۵ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه و ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه در دستگاه Light Cycle96 (Roche, Germany) انجام شد. نسبت بیان ژن ها از طریق روش $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ 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 آلودگی در زیر هود لامینار انجام گرفت.

بررسی پرولیفراسیون سلولی با روش MTT: ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول TE-8 که حاوی ۱۵×۱۰^{۳} سلول بود در هر چاهک از پلیت های ۹۶ خانه‌ای 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 ۵۰، ۷۵ 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 ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۲ mg/ml) (Bio Basic, Canada) به هر چاهک اضافه شد. سپس سلول ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و CO_2 ٪۵ قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون، محیط داخل چاهک ها خارج شد و ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO (AppliChem, Germany) و ۲۵ میکرولیتر از بافر سورنسون به هر چاهک اضافه شد. پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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

جدول ۱- توالی پرایمرها و توالی میکروRNAها

Name		Sequence
Vimentin	Forward	5′- GCGCACAAATCCCTTCTACC-3′
	Revers	5′-ATCCGTGTAGCACATTCTGTCC-3′
Beta-actin	Forward	5′-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3′
	Revers	5′-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3′
miR-34a	Target sequence	5′-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3′
SNORD47	Target sequence	5′-CCUGGAUGAUGAUAGCAAAUGCUGACUGAACAUGAACAUGAAGGUCUU AAUUAGCUCUAACUGACU-3′

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

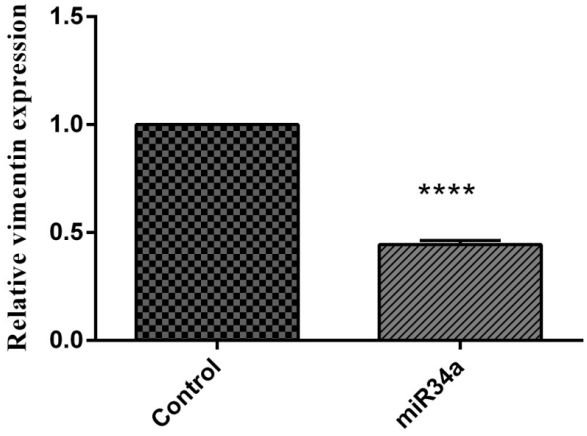
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

سه بار تکرار انجام گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 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 $p<۰/۰۵$ نظر گرفته شد.

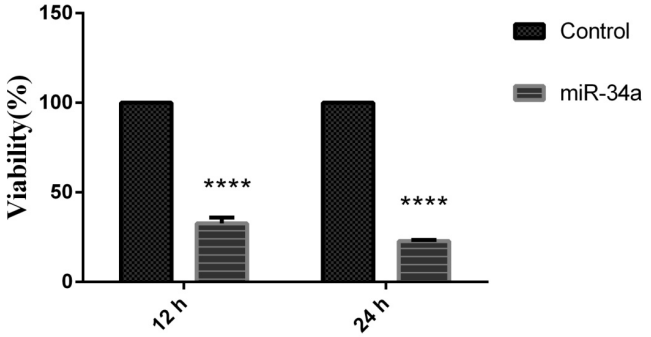
یافته‌ها

قبل از شروع آزمایشات، زمان و دوز مؤثر جایگزینی miR-34a بر روی سلول‌های TE-8 بدست آمد، و از سه دوز ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ نانومول و زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد. در زمان ۲۴ ساعت و دوز ۱۰۰ نانومول بیشترین بیان را miR-34a داشت.

تعیین اثر miR-34a بر روی بیان ژن *vimentin* در 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* می شود ($p<۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۱). از آنجایی که vimentin در روند متاستازیس سرطان نقش ایفا می‌کند بنابراین می توان 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



نمودار ۱- سطح بیان ژن **Vimentin** بعد از جایگزینی miR-34a در سلول های 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 mean ± SD نشان داده شدند. **** $p<0.0001$ در مقابل کنترل می‌باشد.



نمودار ۲- تاثیر 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 سلول ها انجام گرفت. داده ها به صورت mean ± SD نشان داده شده اند. **** $p<0.0001$ در مقابل کنترل می‌باشد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

عنوان کنترل داخلی در تمام گروه‌ها یکسان بوده است (p>۰/۰۵).

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<۰/۰۰۰۱) تکثیر سلولی را کاهش دهد (نمودار ۲). p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان رابطه معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان از بیماری های 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 اصلی‌ترین چالش در تشخیص اختصاصی بوده و به تبع آن درمان‌های غیر اختصاصی و نامناسب را موجب می‌شود (۱۱، ۱۲). از این رو مطالعات گسترده 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 ۲۲-۱۹ نوکلئوتید) و غیر کد کننده هستند که به عنوان تنظیم کننده های بعد از رونویسی بیان ژن، در گستره ی وسیعی از حیوانات، گیاهان و ویروس ها، عمل می کنند و در پدیده های زیستی نقش حیاتی ایفا می کنند (۱۴). بیش از ۳۰۰ miRNA در بدن مشخص شده اند که وظیفه ی 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 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 تومورساپرسوری دارد وهمچنین نشان دادند که Let-7می‌تواند یک پتانسیل درمانی در درمان سرطان ریه باشد (۱۸). این یافته ها نشان می دهد تکنیک بازگردانی بیان miRNA های تومورساپرسور در سرطان، می‌تواند بعنوان یک هدف درمانی باشد (۱۸، ۱۹).

miRNA های تغییر بیان یافته منجر به تومورزایی می شوند 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 کننده های مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز)، ژن‌هایی که تقسیم سلولی را کنترل می کنند، یا ژن‌هایی که DNA را ترمیم می کنند (۲۰).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که سطح بیان ژن *Vimentin* بعد از جایگزینی miR-34a در سلول‌های سرطانی مری با روشqRT-PCR کاهش چشمگیری نشان داد (P < ۰/۰۰۰۱). از آنجایی که vimentin در روند متاستازیس سرطان نقش ایفا می‌کند (۲۱) بنابراین می توان اظهار نظر کرد که miR-34a می‌تواند روند متاستازی بودن سرطان مری 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 < ۰/۰۰۰۱).

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

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 مطالعه ای که توسط جین و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، مشاهده گردید که بیان miR-34a در بافت های آدنوکارسینومای کیسه صفرا در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد و بطور قابل توجهی با پیش‌آگهی ضعیف بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای کیسه صفرا 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 نرمال مجاور کاهش یافته است. علاوه بر این، بیان پایین miR-34a با درگیری گره های لنفاوی، مرحله پیشرفته، تمایز تومور و میزان بالای عود مجدد تومور ارتباط دارد. بنابراین نتایج به دست آمده، نشان داد که بیان کاهشی miR-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 miR-34a در ESCC (esophageal squamous-cell carcinoma) به طور قابل توجهی در مقایسه با بافت مری نرمال مجاور کاهش یافته است. بیان پایین miR-34a در ESCC به طور قابل توجهی با تمایز تومور، وضعیت گره لنفاوی و مرحله بالینی پیشرفته مرتبط است. بنابراین بررسی یافته های مطالعه آن‌ها نشان می دهد که بیان miR-34a در ESCC انسانی کاهش یافته ، و نشان دهنده نقش مهم کاهش بیان miR-34a در پیشرفت و پیش‌آگهی ESCC است (۲۶).

بسیاری از مدل های موشی نشان داده اند که افزایش miR-34 منجر به کاهش اندازه تومور بدون عوارض جانبی می شود، 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 می شود 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 پپتید ۴۶۶ آمینو اسیدی (۵۳kDa)، پروتئین بسیار محافظت شده متعلق به خانواده فلامنت های حد واسط نوع III بیان شونده در سلولهای مزانشیمی است (۲۸) و نشان دهنده یکی از تقریبا ۴۰ عضو خانواده چندژنی فیلامنت های حد واسط 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 پروتئین ها، آن را یک تنظیم کننده بالقوه عملکردهای 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 پروتئین های حیاتی درگیر در اتصالات، مهاجرت و سیگنالینگ سلولی عمل می‌کند. ویمنتین در طول رشد جنین و عمدتا در مرحله شیار اولیه (Primitive streak stage) بیان می‌شود، درحالی‌که 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 (۲۱، ۲۹). افزایش بیان ویمنتین در چندین سرطان نوع اپیتیالی گزارش شده است. افزایش بیان ویمنتین در سرطان با افزایش رشد تومور، تهاجم و پیش‌آگهی بد مرتبط است. در این مطالعه نشان داده شد که جایگزینی miR-34a در سلول‌های سرطانی مری باعث کاهش بیان ژن ویمنتین می شود بنابراین جایگزینی miR-34a در سلول‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

سرطانی مـری می‌توانـد نقـش مهـاری در رونـد ایجـاد سرطان از طریق کاهش بیان ژن ویمنتین داشته باشد.

درمان‌های متداول امروزی از جمله شیمی درمـانی و جراحـی تـأثیر چشـمگیری بـر روی سـرطان مـری متاستاتیک ندارند و تمام تلاش بشر بر این هست که بـا هدف درمانی و ژن درمانی بتواند ایـن سـرطان را مهـار کند. از طرفی تشخیص سریع سرطان نیز یکی دیگـر از دغدغه‌های علـم امـروزی می‌باشـد کـه تـلاش فراوانـی صورت می‌گیرد که مارکرهایی شناسایی کنند که توسط افزایش یا کـاهش بیـان ایـن مارکرهـا در بـدن بتواننـد سریعا سرطان مری را شناسایی کننـد. در ایـن مطالعـه نشان داده شـد کـه miR-34a احتمـالا می‌توانـد نقـش درمانی و همچنین نقش مارکری برای تشخیص سرطان مری داشته باشد.

تقدیر و تشکر

از کارشناسان مرکـز تحقیقـات ایمونولـوژی دانشـگاه علوم پزشکی تبریز تشـکر و سپاسـگزاری کـرده کـه 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. 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-Gutierrez 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. Khoshmirsafa 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]

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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1398.26.9.4.0]