

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم / شماره ۳۱۱ / هفته چهارم دی ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۲۱

بررسی تأثیر miR-۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در ردهی سرطان معده‌ی انسانی MKN-۴۵

ثریا قاسمی^۱، دکتر حسین مزدارانی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان معده، از متداول‌ترین سرطان‌ها در جهان و دومین عامل مرگ انسان در اثر سرطان است. MicroRNAs گروهی از RNAهای درون‌زاد کوچک غیر کدکننده با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید هستند. افزایش بیان miR-۳۷۲ در برخی سرطان‌ها، با کاهش بیان هدف آن (LATS۲) نقش انکومیری دارد. کاهش بیان LATS۲ منجر به عدم تنظیم چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و تکثیر سلولی می‌گردد.

روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از ترانسداکشن لنتی ویروس، بیان miR-۳۷۲ در رده‌ی سلولی MKN-۴۵ افزایش یافت. پس از انتخاب سلول‌های مثبت، میزان بیان miR-۳۷۲ و LATS۲ با تکنیک Real time PCR (Real time polymerase chain reaction)، اندازه‌گیری شد. روش سنجش میکرونوکلئتی، جهت بررسی وجود یا عدم وجود میکرونوکلئتی برای مقایسه‌ی ناپایداری ژنومیکی در سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲ در مقایسه با سلول‌های شاهد، انجام شد.

یافته‌ها: در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد، مقدار بیان miR-۳۷۲ به طور معنی‌داری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترانسداکشن، به ترتیب ۷/۸۵، ۲۲/۵۰ و ۶۸/۱۱۴ برابر افزایش یافت ($P = ۰/۰۳۰$). بیان LATS۲ در مقایسه با سلول‌های شاهد، در این روزها به ترتیب ۳۹/۰، ۲۹/۰ و ۱۵/۰ برابر کاهش یافت ($P = ۰/۰۱۶$). همچنین، ناپایداری ژنومیکی سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد به میزان معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: در رده‌ی سلولی MKN-۴۵، LATS۲ هدف miR-۳۷۲ است. با افزایش بیان miR-۳۷۲، LATS۲ کاهش بیان می‌یابد. کاهش LATS۲ منجر به ناپایداری ژنومیکی در طی تقسیم سلول و ایجاد میکرونوکلئتی می‌گردد و از این رو، می‌تواند بازدارنده‌ی توموری مهمی در سرطان معده باشد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، miR-۳۷۲، LATS۲، ناپایداری ژنومیکی

ارجاع: قاسمی ثریا، مزدارانی حسین، سلیمانی مسعود. بررسی تأثیر miR-۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در رده‌ی سرطان معده‌ی انسانی MKN-۴۵. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۴۷-۲۰۳۵

مقدمه

سرطان معده، یکی از متداول‌ترین سرطان‌ها در سطح جهان و دومین عامل مرگ و میر در انسان

است. کارسینوژنز معده، فرایندی چند مرحله‌ای است. هر چند تغییرات ژنتیکی درگیر در شروع و پیشرفت این سرطان، هنوز به خوبی مشخص نیست، اما عوامل

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Email: mozdarah@modares.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین مزدارانی

دچار افزایش و یا کاهش بیان می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد miRNAs مرتبط با مراحل مختلف سرطان معده، در تشخیص زودهنگام این سرطان مؤثر هستند (۱۲-۱۴). miRNAs که به عنوان نشانگرهای زیستی (Biomarkers) برای سرطان معده اثبات و مشخص شده‌اند، دارای پتانسیل‌هایی هستند که ممکن است با دست‌ورزی آن‌ها بتوان در آینده به اثرات درمانی جدید این سرطان دست یافت (۱۵).

miR-372 در بافت‌های طبیعی و سرطانی مختلف، ژن‌های هدف متنوعی دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند، افزایش بیان miR-372 در سلول‌های برخی سرطان‌ها، می‌تواند با تأثیر بر میزان بیان بازدارنده‌ی تومور (Tumor suppressors) LATS2 (Large tumor suppressor kinase 2)، در برهم زدن تنظیم چرخه‌ی سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوز، نقش انکو میری (Oncomir) داشته باشد (۲۰-۱۶، ۱۳). LATS2 بازدارنده‌ی توموری است که در عملکرد صحیح سانتروزوم‌ها، القای آپوپتوز، برخی نظارت (Checkpoints) های سلولی، تنظیم چرخه‌ی سلولی و حفظ ثبات ژنتیکی سلول در حین تقسیم میتوز، نقش تنظیم کننده دارد (۲۳-۲۱). نقش miR-372 تاکنون در سرطان معده، تنها در مطالعه‌ی Cho و همکاران بررسی شده است. این مطالعه نشان داد رده‌ی سلولی سرطان معده‌ی انسانی AGS نسبت به رده‌های دیگر سرطان معده، بیان بالاتری از miR-372 دارد و از طریق کاهش میزان بیان LATS2 منجر به ویژگی‌های تومورزایی در این رده‌ی سلولی می‌گردد. کاهش miR-372 از طریق ترانسفکشن الیگونوکلوئوتید مکمل آن، میزان پروتئین LATS2 را افزایش می‌دهد و باعث کاهش سرعت رشد سلول‌ها و افزایش

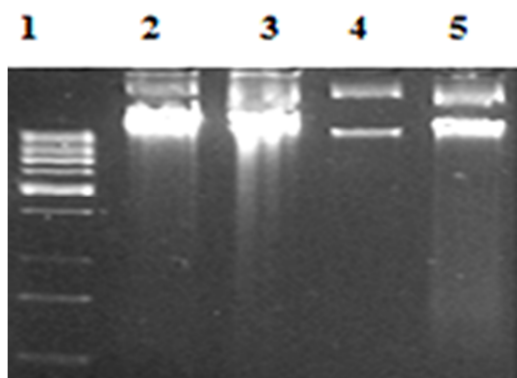
ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی مختلفی برای آن در نظر گرفته‌اند (۱). از زمان شناسایی miRNAs (MicroRNAs)، مشخص شده است که miRNAs نیز از مواردی هستند که در تومورزایی انسان درگیرند. با کشف این موضوع فصل جدیدی از مطالعه جهت شناسایی علل و درمان سرطان‌های انسانی گشوده شده است (۲).

miRNAs RNAهای درون‌زاد (Endogenesis) و غیر کد کننده با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید هستند (۳-۴). miRNAs می‌توانند به صورت مکمل به توالی مناطق غیر ترجمه شونده (۳'-UTR یا ۳'-Untranslated region) mRNA هدف، متصل گردند و منجر به مهار پس از رونویسی آن گردند (۵-۶). برخی miRNAs در فرایندهای مختلف سرطانی شدن، نقش انکوژنی و برخی نقش بازدارندگی از تومور دارند. miRNAsی که بیان ژن‌های بازدارنده‌ی توموری و یا ژن‌های درگیر در فرایندهای تمایز سلولی را کم می‌کنند و بنابراین با القای تکثیر، رگ‌زایی و تهاجم، منجر به شکل‌گیری تومور می‌گردند، OncomiRs نام دارند. به طور مشابه، miRNAsی که بیان ژن‌های دارای فعالیت انکوژنی را کاهش می‌دهند، miRNAs بازدارنده‌ی تومور نامیده می‌شوند (۷). عملکردهای متنوعی در رابطه با سرطان‌ها برای این دو گروه miR شناخته شده است (۸-۱۰). با استفاده از پروفایل‌های بیانی miRNAs در تومورهای انسانی، به نظر می‌رسد تغییر در بیان طبیعی miRNAs با تشخیص، پیش‌آگهی، مراحل تکامل و پاسخ به درمان در سرطان‌ها مرتبط هستند (۱۱).

مطالعات با استفاده از پروفایل‌های miRNAs نشان می‌دهد که برخی miRNAs در سرطان معده نیز

(*Escherichia coli*) سوش DHF α ، با روش شوک حرارتی و با کمک بافر کلرید کلسیم (1 M) تغییر شکل یافتند. باکتری‌های تغییر شکل یافته، با کشت شبانه، در محیط کشت باکتری جامد حاوی آنتی‌بیوتیک پروکاریوتی مناسب که پلاسمیدها حامل ژن مقاومت آن هستند، تکثیر شدند. از هر پلیت کشت باکتری که حاوی تعداد متعددی کلونی باکتری بود، یک تک کلونی به محیط LB (Lysogeny broth) مایع حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب منتقل شد.

پس از کشت شبانه در انکوباتور شیکردار و با انتقال 500 μ l از محیط کشت حاوی باکتری به 50 ml محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک، باکتری‌ها، جهت کشت شبانه به انکوباتور شیکردار، منتقل گردید. پس از این زمان، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeneAll, Korea) پلاسمیدها به صورت جداگانه، استخراج شدند و کمیت و کیفیت آن‌ها با استفاده از میزان جذب نوری و ران نمودن بر روی ژل آگارز تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. نمونه‌ای از الکتروفورز پلاسمیدهای مورد استفاده در بسته‌بندی ویروس، بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۳ μ l از هر پلاسمید به همراه ۱ μ l ژل رد ران گردید. از سمت چپ: ۱: نشانگر 1، 2: psPAX γ ، 3: pMD γ .G، 4: Lenti-blank، 5: Lenti-miR-372

آپتوز در این رده‌ی سلولی می‌گردد (۱۷).

سرطان معده، به جز در مراحل پیشرفته علائم خاصی ندارد. از این رو، شناسایی نشانگرهای زیستی برای تشخیص سریع‌تر این سرطان، گامی اساسی در درمان مؤثرتر این سرطان است (۲۴). در مطالعات مختلف، نقش miR-372 در سایر سرطان‌ها (۱۷-۱۳، ۱۰) و نقش LATS2 در صحت و پایداری ژنومی در سلول‌های فیروپلاستی (۲۳-۲۱) نشان داده شده است.

با توجه به شواهدی که نشان دهنده‌ی شباهت نقش miR-372 در ایجاد برخی ویژگی‌های اختصاصی در مراحل اولیه‌ی سرطان معده، به خصوص سرعت بالای تقسیم سلولی بدون ترمیم ماده‌ی ژنتیکی سلول‌ها است (۲۵، ۱۷) و از آن جا که پیرامون نقش miR-372 در سرطان معده، مطالعه‌ی چندانی صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه آشکارسازی اثر افزایش بیان القایی miR-372 با استفاده از ترانسداکشن لنتی ویروس حامل آن، در رده‌ی سلولی MKN-45 بر بیان LATS2 بود. در این مطالعه، همچنین برای اولین بار، تأثیر افزایش بیان القایی miR-372 بر تغییر در پایداری ژنومیک در رده‌ی سلولی MKN-45 بررسی گردید.

روش‌ها

تهیه‌ی پلاسمیدها

با ترانسفکشن پلاسمیدهای حامل قطعات ژنوم لنتی ویروسی در سلول مناسب جهت بسته‌بندی و ایجاد ذرات ویروسی، ذرات ویروسی بسته‌بندی و تهیه شدند. پلاسمیدهای مورد نیاز در تهیه‌ی ذرات لنتی ویروس (از شرکت Canada, abm) خریداری شدند. پلاسمیدها به صورت جداگانه، در باکتری مستعد *E.coli*

بسته‌بندی لنتی ویروس و ترانسداکشن miR-372

سلول‌های کلیه‌ی جنین انسانی (HEK293T یا Human embryonic kidney)، سلول‌هایی مناسب جهت بسته‌بندی ویروس (Virus packaging) و تهیه‌ی ذرات ویروسی هستند و در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. این رده‌ی سلولی در شرایط کشت در محیط کشت سلولی DMEM;) Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO-BRL) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS یا Fetal bovine serum) (GIBCO-BRL) در پلیت‌های ۱۰ cm در شرایط انکوباتور، با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ °C کشت داده شد. محیط کشت سلول، هر دو روز یک بار تعویض شد. لنتی ویروس با استفاده از ترانسفکشن همزمان سه پلاسمید حامل قطعات مختلف ژنوم لنتی ویروس، با بافر کلسیم فسفات در غلظت و اسیدیته‌ی مناسب، در سلول‌های HEK 293T تهیه شد.

سلول‌های HEK 293T (HEK) پس از کشت و رسیدن به تعداد تقریبی ۵ × ۱۰^۶، که حدود ۷۵ درصد سطح پلیت را پوشش داد، در مرحله‌ی لگاریتمی رشد سلول‌ها، با استفاده از پلاسمید حامل ژن‌های پوششی، pMD2G، پلاسمید بسته‌بندی psPAX2 و پلاسمید حامل miR-372 و نشانگر GFP (Green fluorescent protein) (cat#mh11132) در Lenti Mira-GFP-has-miR-372 vector و در پلیت دیگر به عنوان شاهد با استفاده از پلاسمیدهای psPAX2، pMD2G و پلاسمید شاهد حامل GFP (Lenti GFP-blank vector, cat#m001) به طور جداگانه ترانسفکت گردید. محیط سطح این سلول‌ها، پس از ۲۴ ساعت حاوی ذرات ویروسی خواهد بود.

محیط حاوی ویروس، تا ۷۲ ساعت با فواصل ۲۴ ساعت یک بار، جمع‌آوری گردید. پس از فیلتراسیون، تغلیظ محیط کشت حاوی ویروس انجام شد. با استفاده از PEG ۸۰۰۰ (Polyethylene glycol ۸۰۰۰) و ۱۶ ساعت Shake شدن در دمای ۴ °C و در نهایت سانتریفوژ با دور بالا، پلت ویروسی حاصل شد که در مقدار ۵۰۰ μl محیط کشت سوسپانسیون و در دمای ۷۰ °C-، نگهداری گردید.

سپس با تیتراسیون نمودن، تعداد ذرات ویروسی در واحد حجم تعیین شد. جهت تیتراسیون، ترانسداکشن حجم‌های مشخصی از محیط تغلیظ شده حاوی ویروس در تعداد ۶۰۰۰۰ سلول HEK293T و تعیین درصد تعداد سلول‌های سبز (GFP⁺) با فلوسایتومتری، صورت گرفت. به این ترتیب، با محاسبه‌ی نسبت سلول‌های GFP⁺ و حجم مورد استفاده از محیط حاوی ویروس، تعداد ذرات ویروسی تهیه شده در واحد حجم به دست آمد.

کشت و ترانسداکشن رده‌ی سلولی MKN-45

رده‌ی سلولی سرطان معده‌ی انسانی (MKN-45)، در محیط کشت سلولی (DMEM; GIBCO-BRL) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰ درصد پنی‌سیلین و استپروتومایسین (GIBCO-BRL)، با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ °C در شرایط انکوباتور در فلاسک‌های کشت سلول T25، کشت داده شد. محیط کشت سلول، هر دو روز یک بار تعویض شد. سلول‌ها در صورت نیاز با استفاده از تریپسین_۰/۲۵ EDTA (GIBCO-BRL) از کف ظرف کشت جدا شدند.

جهت به دست آوردن بهترین غلظت استفاده از ویروس جهت ترانسداکشن در این رده‌ی سلولی

این تحقیق را نشان می‌دهد. از زمان ترانسداکشن به مدت ۲۱ روز و با فاصله‌های زمانی ۷ روز یک بار، از سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-372 و لنتی ویروس شاهد و نیز سلول‌های تیمار نشده، با استفاده از RiboEx reagent (GeneAll, Korea) استخراج RNA تمام صورت گرفت. RNA استخراج شده در روزهای ذکر شده، جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت (thermo#K1621) با پرایمر oligo (dT) جهت بررسی میزان تغییرات بیان LATS2 و با استفاده از کیت (Stratagene#60545)، جهت بررسی تغییرات بیان miR-372 استفاده شد. تغییرات بیان LATS2 با استفاده از GAPDH به عنوان شاهد داخلی و کیت (TAKARA#RR820A) و تغییرات بیان miR-372 با استفاده از RNAU6B به عنوان شاهد داخلی و کیت (Stratagene#60545) بررسی شد. Real time PCR در دستگاه ABI Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام شد. بیان نسبی با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بررسی شد.

سنجش میکرونوکلی (MN assay) یا (Micronuclei assay)

سلول‌های ترانسداکت شده و شاهد در فلاسک‌های کشت سلول T25، با $4 \mu\text{g/ml}$ (Sigma) $100 \mu\text{l}/5\text{ml}$ (Cytchalasin B) Cyt-B به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلول، انکوبه شدند. پس از این زمان، سلول‌ها از ظروف کشت با استفاده از تریپسین-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) محصول برداری شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS (Phosphate buffered saline) سرد و سانتریفیوژ نمودن آن‌ها به مدت ۵ دقیقه در

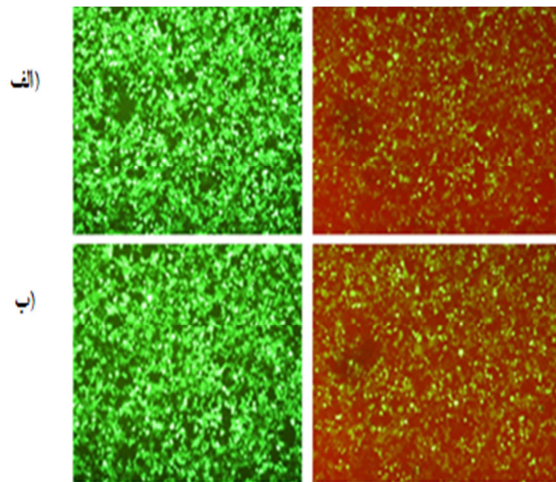
(MOI یا Multiplicity of infection)، 20000 سلول در تعدادی چاهک از یک پلیت ۴۸ خانه کاشته شد. غلظت‌های مختلف ویروس با ۳، ۵ و ۱۰ برابر تعداد سلول‌های کاشته شده در هر چاهک، به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۱۶ ساعت از ترانسداکشن، محیط حاوی ویروس، از سطح سلول‌ها با محیط کشت تازه، تعویض شد. سلول‌ها جهت بررسی مورفولوژی و میزان GFP^+ بودن توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت مشاهده شدند و مناسب‌ترین میزان ویروس جهت ترانسداکشن این رده‌ی سلولی انتخاب شد.

جهت افزایش کارایی ترانسداکشن $2 \mu\text{g/ml}$ Hexadimethrine bromide; Sigma- H9268) Polybrene (Aldrich, No. به محیط کشت افزوده شد. ذرات ویروسی حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک یوکاریوتی پورومایسین هستند. جهت به دست آوردن رده‌ی سلولی MKN-45، با بیان پایدار و خلوص بالای سلول‌های GFP^+ $2 \mu\text{g/ml}$ آنتی‌بیوتیک پورومایسین، پس از ۴۸ ساعت از زمان ترانسداکشن، جهت انتخاب سلول‌های GFP^+ استفاده شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real time PCR

جهت Real time PCR (Real time polymerase chain reaction)، با استفاده از سایت primer³PLUS برای cDNA LATS2 و cDNA GAPDH (reaction phosphate) $3'$ -dehydrogenase complementary DNA (Glyceraldehyde) پرایمرهای رفت و برگشت و با استفاده از سایت IDT برای cDNA miR-372 و cDNA RNAU6B پرایمرهای رفت، (پرایمرهای برگشت در کیت تعبیه شده است) طراحی شد. جدول ۱، توالی پرایمرهای طراحی و استفاده شده در

آن جا که پلاسمید حامل miR-372 استفاده شده جهت تهیهی لنتی ویروس حامل ژن پروتئین سبز فلورسنتی (GFP) است، رنگ سبز سلول‌ها (بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها GFP⁺ بود) نشان دهندهی ترانسفکشن صحیح و بسته‌بندی و شکل‌گیری ذرات ویروسی در این سلول‌ها بود (شکل ۲). با تیتراسیون و تعیین درصد میزان GFP⁺ سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت از ترانسداکشن، مشخص شد تعداد ذرات ویروسی در هر میکرولیتر از محیط کشت پس از تغلیظ نمودن، ۱۱۲۵ ذره ویروسی می‌باشد.



شکل ۲. سلول‌های HEK-293T پس از ۴۸ ساعت از ترانسفورماسیون، با میکروسکوپ فلورسنت رنگ سبز GFP (Green fluorescent protein) در این سلول‌ها مشاهده شد که نشان دهندهی کارآمد بودن ترانسفورماسیون و تولید لنتی ویروس بود. الف) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-372 و ب) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد

ترانسداکشن لنتی ویروس

کارایی MOI‌های مختلف لنتی ویروس برای ردهی سلولی MKN-45 با استفاده میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. با ترانسداکت نمودن

۱۲۰۰ rpm، سلول‌ها در ۰/۰۷۵ M KCl سرد سوسپانسیون شدند و پس از سانتریفیوژ، پلت‌های سلولی در محلول فیکس (۳:۱ متانول: اسید استیک) سوسپانسیون شدند و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق دوباره سانتریفیوژ گردیدند. پس از دو بار شستشو در محلول فیکس دوم (۶:۱ متانول: اسید استیک) و سوسپانسیون نمودن در این محلول، سلول‌ها به یک لام شیشه‌ای تمیز منتقل شدند. سپس سلول‌ها در گیمسای ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشوی گیمسای اضافه با آب و خشک شدن، لام‌ها جهت بررسی هسته‌ها و شمارش هزار سلول دو هسته‌ای در هر گروه سلول و به دست آوردن تعداد سلول‌های دو هسته‌ای حاوی میکرونوکلئای در این میان، با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ استفاده شدند.

سنجش آماری

همه‌ی بررسی‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند. نتایج به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نشان داده شدند. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری نتایج آماری در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی شد.

یافته‌ها

تهیهی پلاسمیدها و بسته‌بندی ویروس در

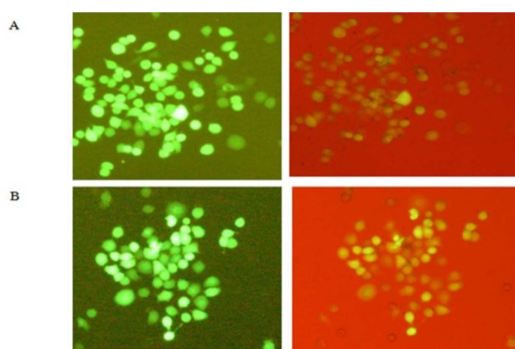
سلول‌های HEK293T

پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌ها، از کیفیت مطلوبی برخوردار بود (شکل ۱). بعد از ۴۸ ساعت از ترانسفکشن پلاسمیدها، سلول‌های HEK293T، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. از

مقدارهای مختلف لنتی ویروس بر این ردهی سلولی، مشخص شد بهترین MOI برای این ردهی سلولی MOI5 بود؛ به این معنی که ترانسداکشن این ردهی سلولی در MOI پایین تر از این مقدار، کارایی کمی داشت و درصد اندکی از سلول‌ها GFP⁺ بودند. در MOI بالاتر نیز سلول‌ها مورفولوژی طبیعی خود را از دست دادند و توانایی زنده ماندن چندانی نداشتند. در MOI5، سلول‌ها در شرایط مورفولوژی مساعد بودند و حدود 42 درصد سلول‌ها GFP⁺ بودند. در نهایت، با انتخاب آنتی بیوتیکی سلول‌های ترانسداکت شده، با استفاده از پرومایسین، بیش از 90 درصد سلول‌ها، GFP⁺ بودند (شکل 3). کشت این سلول‌ها تا رسیدن به تعداد کافی جهت بررسی‌های بعدی ادامه یافت.

نتایج Real time PCR

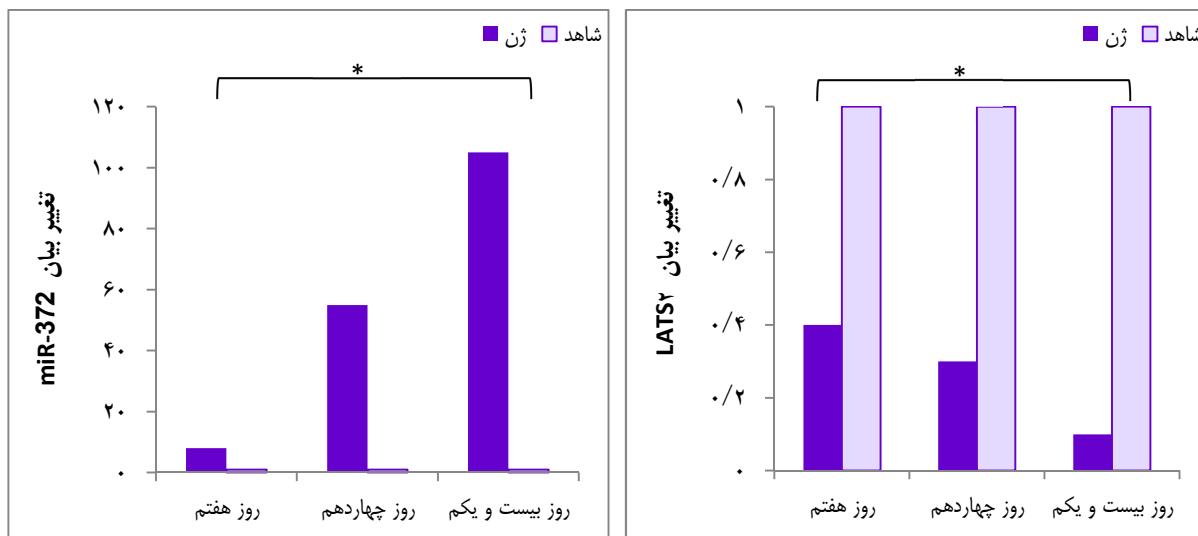
با استفاده از پرایمرهای طراحی شده جهت Real Time PCR، Real time PCR انجام شد (جدول 1). پس از آنالیز اطلاعات حاصل از Real time PCR، نتایج نشان داد که میزان بیان miR-372 در اثر ترانسداکشن افزایش معنی‌داری یافت و در روز 7 به 7/85، در روز 14 به 50/22 و در روز 21 پس از ترانسداکشن، به بیش از 114 برابر سلول‌های شاهد رسید (P = 0/030). افزایش بیان



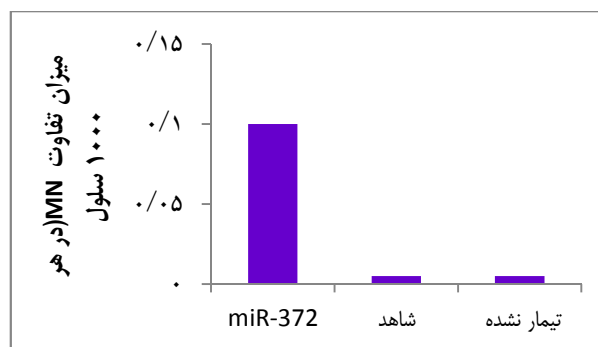
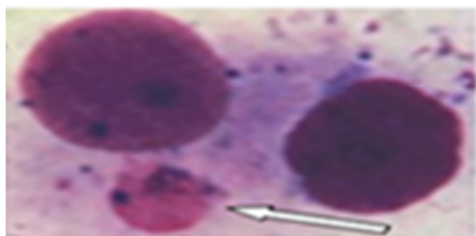
شکل 3. بیش از 90 درصد سلول‌های ردهی سلولی MKN-45 پس از انتخاب سلول‌های ترانسداکت شده توسط آنتی بیوتیک یوکاریوتی پرومایسین، به صورت ثابت GFP⁺ هستند. (A) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-372 (B) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد

جدول 1. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

پرایمر	توالی
LATS2-Forward	5'-CACTCAACTCTGTGACTGGTG-3'
LATS2-Reverse	5'-CCAGTTGATCACCTTCAGC-3'
GAPDH-Forward	5'-CTCTCTGCTCCTCTGTTTCG-3'
GAPDH-Reverse	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'
miR-372-Forward	5'-AAAGTGCTGCGACATTTGAG-3'
RNAU6B-Forward	5'-AAATTGGAACGATACAGAGAAG-3'



شکل ۴. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترانسداکشن، تغییر بیان miR-372 و LATS2 بررسی شد. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. سطح بیان miR-372 با RNAU6B به عنوان شاهد داخلی طبیعی سازی گردید. هیچ تغییری در میزان بیان miR-372 در گروه آلوده شده با وکتور خالی لنتی ویروسی نسبت به گروه شاهد دیده نشد ($P > 0/050$). سطح بیان LATS2 با GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان شاهد داخلی طبیعی سازی گردید. هیچ تغییری در میزان بیان LATS2 در گروه ترانسداکت شده با وکتور خالی لنتی ویروسی نسبت به گروه شاهد دیده نشد ($P > 0/050$).



شکل ۵. سنجش میکرونوکلئیتی: سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئیتی. پیکان میکرونوکلئیتی را نشان می‌دهد. میزان تفاوت MN (میکرونوکلئیتی) در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$).

سنجش میکرونوکلئیتی

ایجاد میکرونوکلئیتی در سلول‌های در حال تقسیم، نشان دهنده ناپایداری ژنومیکی و عدم حفظ ثبات و تقسیم مساوی ماده ژنتیکی بین دو سلول دختری است. سیتوکالازین B، سیتوکیناز را در چرخه‌ی سلولی میتوزی باز می‌دارد و باعث ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای می‌گردد. در صورت عدم تقسیم مساوی

ماده ژنومیکی بین سلول‌ها و ناپایداری‌های ژنومیکی، سلول‌های دو هسته‌ای حامل میکرونوکلئیتی خواهند بود.

در این مطالعه، همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده در هر گروه از سلول‌های تیمار شده و سلول‌های شاهد، تفاوت معنی‌داری بین سلول‌های

سرطان معده مرتبط هستند، شناسایی زودهنگام آن‌ها به عنوان نشانگر زیستی قابل توجه است (۱۴). در این مطالعه، نقش miR-372 جهت شناسایی ژن هدف و عملکرد مرتبط با آن در سرطان معده در *in vitro* در رده‌ی سلولی MKN-45 برای اولین بار بررسی شد. نقش miR-372 در سرطان‌های مختلفی بررسی و اثبات شده است.

Voorhoeve و همکاران نشان دادند که miR-372 و miR-373 در تومورهای سلول‌های زیای بیضه نقش انکوژنی دارند (۱۶). به علاوه، در مطالعه‌ای بر روی ۱۴۴ بیمار با سرطان روده‌ی بزرگ نیز نشان داده شد که miR-372 به واسطه‌ی کاهش LATS2 منجر به تومورزایی در این سرطان می‌گردد (۱۸).

Belair و همکاران نشان دادند که بیان miR371-3 در عفونت هلیکوباکتر پیلوری کاهش می‌یابد. کاهش miR-372 با افزایش بیان LATS2 مرتبط است (۲۵). miR-372 در مراحل پیشرفت سرطان گلیوما، LATS2 را مورد هدف قرار می‌دهد و با پیشرفت مراحل گلیوما مرتبط است (۳۰). Yu و همکاران نشان دادند که miR-372 یکی از ۵ MicroRNA است که در زنده ماندن بیماران مبتلا به سرطان NSCLC (Non-small cell lung cancer) مؤثر است. بیان LATS2 در بافت‌های مبتلا به سرطان در مقایسه با بافت سالم اطراف، در این بیماران کاهش یافته است (۱۹).

از سوی دیگر، در سرطان‌های کبد و سرویکس مشخص شده است که miR-372 از طریق مسیرهای سیگنالینگ دیگری نقش بازدارندگی از تومور دارد و در سلول‌های این سرطان‌ها نسبت به بافت‌های سالم اطراف کاهش بیان یافته است (۳۱-۳۲). از این رو،

تیمار شده و شاهد حامل میکرونوکلی دیده شد ($P < 0/001$). تفاوت آماری تعداد سلول‌های حامل میکرونوکلی بین سلول‌های ترانسداکت شده‌ی شاهد و ترانسداکت نشده، معنی‌دار نبود.

بحث

نشانگرهای زیستی اختصاصی و بسیار حساس برای تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه بسیار ناکافی هستند. از آن‌جا که بقای بیماران بستگی به مراحل سرطان معده دارد، ضروری است که نشانگرهای زیستی مولکولی برای تشخیص‌های ابتدایی این سرطان و نیز پیشرفت‌های درمانی آن در آینده شناسایی شوند (۲۶). MiRs در شبکه‌های پیچیده‌ی تنظیم بیان ژن‌های مختلف، نقش‌های با اهمیتی دارند (۲۷). miRs کاندیداهای مورد قبولی برای پیشرفت حساسیت تشخیصی نشانگرهای توموری برای مراحل پایین و بنابراین افزایش شانس بقای بیماران سرطانی هستند. مطالعات مختلف، اهمیت آن‌ها را در این زمینه نشان داده است (۲). مطالعات عملکردی miRNAs نیز نشان دهنده‌ی دخالت آن‌ها در فرایندهای مولکولی و زیست‌شناختی منجر شونده به تومورزایی است. در دهه‌ی گذشته، شواهد فراوانی از نقش عدم تنظیم بیان miRs در پاتوژنز و پیشرفت تومورهای انسانی از جمله سرطان معده، منتشر شده است (۲۸). امروزه از miRNAs با عنوان نشانگرهای زیستی جدید سرطان، یاد می‌شود (۲۹).

از طرفی، ارتباط عدم تنظیم miRs با سرطان‌ها پتانسیل بالایی استفاده از آن‌ها به عنوان اهداف درمانی مداخله‌ای را نشان می‌دهند. طبق نتایج تحقیقات قبلی، از آن‌جایی که miRNAs با مراحل مختلف

ممکن است miR-372 در سرطان‌های مختلف نقش‌های متنوعی داشته باشد و مسیرهای سیگنالینگ مختلفی را هدف قرار دهد. از این رو لازم است نقش miR-372 در سرطان‌های مختلف بررسی و مسیر سیگنالینگ آن در هر سرطان مشخص شود. در این مطالعه، مشخص شد که افزایش القایی بیان miR-372 باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان LATS2 در سلول‌های سرطان معده در *in vitro* می‌گردد. این نتیجه نشان داد در سلول‌های سرطان معده همچون برخی سرطان‌های دیگر، miR-372 حداقل یکی از عوامل تنظیم‌کننده‌ی میزان بیان LATS2 است. LATS2 یک پروتئین کیناز مهم در تنظیمات چرخه‌ی سلولی است و عملکرد بازدارندگی از تومور دارد (۱۹-۱۶).

نتایج بررسی تغییرات بیان در این مطالعه، بر روی سلول‌های رده‌ی MKN-45 از سرطان معده، نتایج مطالعه‌ی Cho و همکاران را در رده‌ی سلولی سرطان معده AGS (۱۷) تأیید کرد و نتیجه‌ی مشابهی با سرطان‌های کولون، بیضه و گلیوما داشت (۲۰-۱۶). گروهی از محققین ثابت کردند که رده‌ی سلولی MKN-45 به میزان چشمگیری حاوی سلول‌های CD44⁺ است (۳۳). گلستانه و همکاران نشان دادند که سلول‌های CD44⁺ که بیش از ۹۰ درصد این رده‌ی سلولی هستند، miR-372 را به میزان کمی بیان می‌کنند (۳۴). با توجه به این یافته‌ها، انتخاب این رده‌ی سلولی برای افزایش بیان القایی miR-372 در این مطالعه مناسب است. در این مطالعه، بررسی نقش miR-372 در سرطان معده در *in vitro* نشان داد که بیان القایی بالای miR-372 با استفاده از لنتی ویروس حامل آن در رده‌ی سلولی MKN-45 به

میزان معنی‌داری بیان LATS2 را کاهش می‌دهد. محققین نشان دادند که سلول‌های فیروپلاست جنینی موش Lats2^{-/-} نقایص سیتوکینازی افزایش یافته‌ای را نشان می‌دهند. از این رو، تجمع میکرونوکلی، ساتروزوم‌های اضافه و آنیوپلوئیدی در این سلول‌ها افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. بنابراین گمان می‌شود این بازدارنده‌ی توموری، ممکن است نقش مهمی در حفظ صحت میتوزی و یکپارچگی ژنومی داشته باشد. حجیم شدن هسته و چند هسته‌ای شدن، نتایج فقدان LATS2 هستند (۳۵، ۲۳). بیشتر این ویژگی‌ها در سلول‌های برخی سرطان‌ها نیز مشاهده می‌گردد. در مطالعات اخیر مشخص شده است که ناهنجاری‌های ساتروزومی می‌توانند در ایجاد بدخیمی‌ها دخیل باشند. در سلول‌های سرطانی، مورفولوژی‌های ناهنجار هسته‌ای، همچون هسته‌ی حجیم و پلوئیدی، میکرونوکلی و چند هسته‌ای شدن، به عنوان اختلالات ناشی از ناهنجاری‌های ساتروزومی شناخته می‌شوند (۳۶-۳۷، ۲۳).

در این بررسی برای اولین بار، افزایش قابل توجه میکرونوکلی در سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس حامل miR-372 نسبت به سلول‌های شاهد، نشان می‌دهد کاهش بیان بازدارنده‌ی توموری هدف آن (LATS2)، ممکن است نقش مهمی در ناپایداری ژنومی داشته باشد (شکل ۵). این تفاوت ناشی از کاهش میزان بیان LATS2 است که نقش بسیار مهمی در صحت تقسیم ژنومیک در حین تقسیم میتوزی در سلول‌های دختری دارد. با وجود این مشاهدات و نتایج در تومورهای مختلف، گمان می‌رود miR-372 از طریق بازدارندگی بیان LATS2 در پیشرفت سرطان درگیر است (۲۰-۱۶). نتایج این تحقیق نشان

MKN-45 تیمار شده با لنتی ویروس حامل miR-372، باعث افزایش میزان میکرونوکلی (شاخصی از میزان ناپایداری ژنومیک در سلول‌ها) گردید. احتمال می‌رود این ناپایداری ژنومیک با تغییرات بعدی در میزان بیان ژن‌های موجود در این مناطق درگیر در ایجاد میکرونوکلی و ناهنجاری‌های کروموزومی حین تقسیمات بعدی میتوز، می‌تواند باعث فرایندهای سلولی بعدی گردد که در نهایت با تومورزایی یا تکامل سرطان معده مرتبط هستند. مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری است.

تشکر و قدردانی

انجام این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفته است. بدین وسیله از مقامات محترم این دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد.

می‌دهد که شاید بیان بالای miR-372 در سرطان معده با تأثیری که بر کاهش LATS2 دارد، در ایجاد و افزایش ناپایداری‌های ژنومیک که از ویژگی‌های اساسی سلول‌های سرطان معده است، نقشی محوری دارد. به طور قطعی، این یافته‌ها احتیاج به بررسی‌های بیشتر برای تأیید نتایج در رده‌های سلولی دیگر سرطان معده، مدل‌های آزمایشگاهی و بافت‌های توموری نسبت به بافت سالم اطراف در بیماران سرطان معده دارد.

نتیجه‌گیری نهایی این که یافته‌های پژوهش حاضر در رده‌ی سلولی MKN-45، نشان داد بیان القایی بالای miR-372 از طریق ترانسداکشن لنتی ویروس حامل آن، منجر به کاهش بیان LATS2 می‌گردد. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که در سرطان معده یا حداقل در آدنوکارسینوما می‌تواند معده که این رده‌ی سلولی از آن مشتق شده است، LATS2 هدف miR-372 می‌باشد. کاهش میزان LATS2 در سلول‌های

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58(2): 71-96.
- Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(3): 470-9.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(1): 23-36.
- Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol* 2011; 3(3): 83-92.
- Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 2010; 14(4): 236-40.
- Takuno S, Innan H. Evolution of complexity in miRNA-mediated gene regulation systems. *Trends Genet* 2008; 24(2): 56-9.
- Di LG, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med* 2010; 16(6): 257-67.
- Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013; 774: 1-20.
- Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y. Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One* 2010; 5(9).
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J*

- Oncol 2009; 34(2): 537-42.
13. Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(4): 652-7.
 14. Song MY, Pan KF, Su HJ, Zhang L, Ma JL, Li JY, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One* 2012; 7(3): e33608.
 15. Yin Y, Li J, Chen S, Zhou T, Si J. MicroRNAs as diagnostic biomarkers in gastric cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13(10): 12544-55.
 16. Voorhoeve PM, le SC, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124(6): 1169-81.
 17. Cho WJ, Shin JM, Kim JS, Lee MR, Hong KS, Lee JH, et al. miR-372 regulates cell cycle and apoptosis of ags human gastric cancer cell line through direct regulation of LATS2. *Mol Cells* 2009; 28(6): 521-7.
 18. Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, Nishida N, Takahashi H, Haraguchi N, et al. MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Oncology* 2012; 82(4): 205-12.
 19. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13(1): 48-57.
 20. Stelzer Y, Sagi I, Benvenisty N. Involvement of parental imprinting in the antisense regulation of onco-miR-372-373. *Nat Commun* 2013; 4: 2724.
 21. Visser S, Yang X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. *Cell Cycle* 2010; 9(19): 3892-903.
 22. (22) Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev* 2006; 20(19): 2687-700.
 23. Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, et al. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *J Biol Chem* 2007; 282(26): 19259-71.
 24. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, et al. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(5): 1672-81.
 25. Belair C, Baud J, Chabas S, Sharma CM, Vogel J, Staedel C, et al. Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell micro RNA cluster to block cell cycle progression. *Silence* 2011; 2(1): 7.
 26. Wang Z, Yang Ch. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer-opportunities and challenges. *Am J Digest Dis* 2014;1(1): 44-9.
 27. Medina PP, Slack FJ. microRNAs and cancer: an overview. *Cell Cycle* 2008; 7(16): 2485-92.
 28. Liao Y L, Tsai K W, Wen-chang Lin. miRNAs in gastric cancer. In: Lotfy M, editor. *Gastric Carcinoma - Molecular Aspects and Current Advances*. Rijeka, Croatia: Intech; 2011. p. 85-104.
 29. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009; 55(4): 623-31.
 30. Li G, Zhang Z, Tu Y, Jin T, Liang H, Cui G, et al. Correlation of microRNA-372 upregulation with poor prognosis in human glioma. *Diagn Pathol* 2013; 8: 1.
 31. Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, et al. Stem cell-like microRNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(47): 20471-6.
 32. Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, et al. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *J Biol Chem* 2011; 286(29): 25556-63.
 33. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27(5): 1006-20.
 34. Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem Funct* 2012; 30(5): 411-8.
 35. McPherson JP, Tamblyn L, Elia A, Migon E, Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J* 2004; 23(18): 3677-88.
 36. Duensing S. A tentative classification of centrosome abnormalities in cancer. *Cell Biol Int* 2005; 29(5): 352-9.
 37. Salisbury JL, Whitehead CM, Lingle WL, Barrett SL. Centrosomes and cancer. *Biol Cell* 1999; 91(6): 451-60.

The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line

Sorayya Ghasemi MSc¹, Hossein Mozdarani PhD², Masoud Soleimani PhD³

Original Article

Abstract

Background: Gastric cancer is one of the most common cancers in the world and the second leading cause of cancer mortality in humans. MicroRNAs are a group of endogenous RNA, small non-coding nucleotides in length of 21-23. Overexpression of miR-372 acts as an oncomir in various types of cancer via down-regulation of its target, LATS2. Down-regulation of LATS2 leads to the loss of cell cycle regulation, apoptosis inhibition, and increased proliferation rate of the cells.

Methods: In this study, we increased the expression of miR-372 with lentivirus transduction inside the GC cell line MKN-45. After selection of positive cells, miR-372 and LATS2 expression levels were measured through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Cytochalasin B blocked (MN) assay was done to verify the presence or absence of MN for comparing genomic instability in treated cells compared to the controls.

Findings: In the treated cells, compared with the controls, the amount of miR-372 expression significantly increased. Fold changes in 7, 14 and 21 days after the transduction were 7.85, 50.22 and 114.68, respectively ($P = 0.030$). In contrast to the control cells, the fold changes of LATS2 expression in these days were 0.39, 0.29 and 0.15, respectively ($P = 0.016$). In addition, compared with control cells, the genomic instability of treated cells increased significantly ($P < 0.001$).

Conclusion: These results indicate that in MKN-45 cell line, LATS2 is a target of miR-372. LATS2 is down-regulated with increased expression of miR-372. Reduce LATS2, leads to genomic instability during cell division and creates micronuclei and hence may be an important tumor suppressor.

Keywords: Gastric cancer (GC), miR-372, LATS2, Genomic instability

Citation: Ghasemi S, Mozdarani H, Soleimani M. **The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(311): 2035-47

1- PhD Student, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hossein Mozdarani PhD, Email: mozdarah@modares.ac.ir