مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۳ و ٤: از ۸۵-۹۳
پاییز و زمستان ۱۳۸٦

مهار بیان ژن نوکلئوستمین در رده سلولی سرطانی مثانه با واسطه استراتژی RNAi

پروانه نیک‌پور[۱]، سیدمهدی جعفرنژاد[۲]، مهدی فروزنده[۳]، سیدجواد مولی[٤*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۲۵ پذیرش مقاله: ۸۷/۴/۲۳

چکیده

هدف: نوکلئوستمین جزء خانواده‌ای از پروتئین‌های هستکی است که به میزان زیادی در سلول‌های بنیادین جنینی، عصبی و مزانشیمی بیان می‌شود و در تنظیم خودبازسازی این سلول‌ها نقش دارد. بیش‌بیان این ژن در رده‌های سلولی سرطانی متعدد و نیز بافت‌های توموری چون تومورهای معده، کبد و پروستات نشان داده شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی آثار سرکوب بیان این ژن در رده سلولی سرطانی مثانه با روش RNAi است.

مواد و روش‌ها: پس از تأیید بیان ژن نوکلئوستمین در رده سلولی سرطانی 5637، الیگونوکلئوتیدهای ۲۱ تایی بر علیه آن به داخل سلول ترانسفکت شده و سرکوب بیان ژن با روش RT-PCR، ایمونوسیتوشیمی و وسترن بلات تأیید شد. آنالیز رشد سلولی با شمارش سلول‌ها انجام گرفت. تغییرات در چرخه سلولی و رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به ترتیب با رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ پروپیودیم آیودید وآنکسین V-FITC مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: ژن نوکلئوستمین به میزان بالایی در سلول‌های 5637 بیان می‌شود. بررسی بیان ژن نوکلئوستمین با روش نیمه‌کمی و پس از تیمار با الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی بر علیه این ژن، کاهشی در حدود ۸۵ درصد را در مقایسه با گروه‌های کنترل نشان داد. علاوه بر این، نتایج ایمونوسیتوشیمی و وسترن بلات نیز تأییدکننده سرکوب بیان ژن در حد پروتئین بود. بررسی منحنی رشد سلول‌ها نشان داد که با گذشت ۷۲ ساعت، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های گروه تیمار شده با الیگونوکلئوتیدهای نوکلئوستمین قابل مشاهده است. بررسی چرخه سلولی نیز بیانگر رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول پس از مهار نوکلئوستمین بود که رنگ‌آمیزی اختصاصی با آنکسین V-FITC نیز این یافته را تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: بیان ژن نوکلئوستمین نقش مهمی در تکثیر سلولی و جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در سلول‌های رده سرطانی 5637 ایفا می‌کند. مطالعات بیشتر در زمینه سرکوب بیان این ژن در محیط بدن می‌تواند در آینده راهگشای یافتن هدف‌های درمانی بالقوه برای سرطان مثانه شود.

کلیدواژگان: نوکلئوستمین، رده سلولی سرطان مثانه 5637، RNAi.

۱- مقدمه

در مدل‌های قبلی سرطان، رشد غیرتنظیم‌شده تومورها به اکتساب تدریجی وقایع ژنتیکی نسبت داده می‌شد که این وقایع منجر به روشن شدن ژن‌های پیش‌برنده تکثیر، خاموشی ژن‌های درگیر در ممانعت از تکثیر و غلبه بر ژن‌های دخیل در مرگ

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی ۱۷۵-۱٤۱۱۵
Email: sjmowla@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

سلولی می‌شد. در مدل جدید برای توجیه سرطان تحت عنوان «مدل سلول بنیادی برای سرطان»، یک واقعه کلیدی در تومورزایی، اختلال در بیان و عملکرد ژن‌های درگیر در تنظیم خودبازسازی (Self-renewal) سلول‌های بنیادی است. بنابراین بعضی از سلول‌های سرطانی در یک تومور، با سلول بنیادی طبیعی از این جهت مشابه‌اند که توانایی تقسیم بدون از دست دادن ظرفیت تکثیر را دارند [۱].

اخیراً تی‌سای (Tsai) و همکاران، ژن جدیدی به نام نوکلئوستمین (*Nucleostemin :NS*) را در سلول‌های بنیادین و تعدادی از رده‌های سلول‌های سرطانی شناسایی کرده‌اند [۲]. پروتئین NS در هستک سلول‌ها موقعیت‌یابی شده است. مطالعات نشان داده است که با اتصال به GTP، پروتئین NS به داخل نوکلئوپلاسم مهاجرت نموده و به پروتئین p53 متصل می‌شود. ظاهراً این اتصال، سبب تداخل در عملکرد مهارکنندگی تومور پروتئین p53 می‌شود. با این حال تاکنون هیچ شواهد آزمایشگاهی مبنی بر تأیید این فرضیه، به‌جز این یافته که این دو پروتئین با هم در هسته هم‌رسوب (Coimmunopercipitate) می‌شوند و طی آزمایش‌های کروماتوگرافی تمایلی (Affinity chromatography) به یکدیگر متصل می‌شوند، ارایه نشده است [۲]. یافته‌های اخیر، نشانگر بیان این ژن در شماری از رده‌های سلولی سرطانی انسانی نظیر رده‌های سلولی سرطانی معده (SGC-7901)، هپاتوکارسینوما (HepG2)، دهانه رحم (Hela)، سینه (MMK-7) و نیز سلول‌های بنیادین مزانشیمی مشتق شده از خون بندناف انسانی و نیز مغز استخوان موش صحرایی و... است [۳-۶]. علاوه بر این، بیش‌بیان ژن *NS* در تعدادی از بافت‌های سرطانی نظیر پروستات، کلیه، کبد، لوزالمعده و... نیز گزارش شده است [۳،۷-۹].

این واقعیت که ژن *NS* در سلول‌های بنیادی و تعدادی از رده‌های سلولی و بافت‌های سرطانی و نه در سلول‌های تمایزیافته بافت‌های بالغ بیان می‌شود، پیشنهاددهنده این است که *NS* در مسیرهای تنظیم‌کننده چرخه سلولی دخالت دارد. با این حال هنوز نقش دقیق این ژن نامشخص است [۲]. تاکنون بیان این ژن و نقش آن در سرطان مثانه مورد بررسی قرار نگرفته است.

در مطالعه حاضر، بیان ژن *NS* در رده سلولی سرطانی مثانه 5637 تأیید شد. سپس به‌منظور بررسی نقش این ژن، استراتژی RNAi (RNA interference) برای سرکوب بیان *NS* به‌کار گرفته شد. نتایج نشان داد که ژن *NS* به میزان بالایی در رده سلولی سرطانی 5637 بیان می‌شود و سرکوب بیان آن سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌ها به همراه افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Apoptosis) می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کشت رده سلولی

رده سلولی 5637 کارسینومای مثانه (انستیتو پاستور-تهران) در محیط کشت RPMI 1640 (Invitrogen)، سرم ۵ درصد، پنی‌سیلین/آمپی‌سیلین ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوباتور کشت سلولی کشت و نگهداری شد.

RNAi -۲-۲

الیگونوکلئوتیدهای سنتز شده ۲۱ زیرواحدی بر علیه توالی mRNA ژن *NS* انسانی و نیز یک توالی نامرتبط (IR: Irrelevant) که هیچ‌گونه مکمل شناخته شده‌ای در ژنوم انسان دارا نبود، با کمک برنامه انتخاب siRNA (Small interfering RNA) در وب‌سایت انستیتو تحقیقات بیومدیکال Whitehead (http://jura.wi.mit.edu/) [۶] طراحی و به‌وسیله شرکت QIAGEN سنتز شد. توالی siRNA اختصاصی انتخاب شده برای *NS* دارای ترادف زیر است.

سنس: GAACUAAAACAGCAGCAGAdTdT

آنتی‌سنس: UCUGCUGCUGUUUUAGUUCdTdT

توالی IR- siRNA نیز به شرح زیراست:

سنس: CUGAUGCAGGUAAUCGCGUdTdT

آنتی‌سنس: ACGCGAUUACCUGCAUCAGdTdT

برای انجام ترانسفکشن (Transfection)، سلول‌ها به تعداد ۱۵۰ هزار سلول به ازای هر چاهک ظرف ۶ خانه به همراه ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. در روز بعد، محیط کشت سلول‌ها تخلیه و با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

سپس الیگونوکلئوتیدهای siRNA در غلظت ۲۰ میکرومول به میزان ۱۰ میکرولیتر (NS یا IR) به ۱۷۵ میکرولیتر Opti-MEM اضافه شد. در یک لوله جداگانه، ٤ میکرولیتر از الیگوفکتامین (Invitrogen) و ۱۱ میکرولیتر از محیط Opti-MEM به ازای هر چاهک، با یکدیگر مخلوط و پس از پیپتاژ (Pipitaj) کامل در مکان ثابت به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. آنگاه این محلول‌ها با یکدیگر مخلوط و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ثابت نگهداری شد. در پی آن، کل سوسپانسیون به همراه ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک حاوی سلول‌های آماده شده برای ترانسفکشن منتقل شد. پس از گذشت ٤ ساعت، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم به هر چاهک اضافه و در هر روز محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد.

۲-۳- استخراج RNA تام سلولی و واکنش (Reverse Transecriptase-PCR) RT-PCR

RNA تام سلولی از سه گروه سلول‌های ترانسفکت شده (Transfected cells) با siRNA اختصاصی علیه ژن *NS*، IR-siRNA و گروه بدون تیمار (C) در زمان‌های ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از ترانسفکشن، با استفاده از محلول RNX^{plus} (Cinnagen) استخراج شد. برای ساخت cDNA از الیگومر تیمیدین (oligo-dT) و آنزیم M-MuLV RevertAid™ (Fermentas) و براساس برنامه ارایه شده توسط شرکت مربوط استفاده شد. پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به‌منظور تکثیر قطعه مورد نظر، واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از cDNA تهیه شده به همراه ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز (Fermentas)، $MgCl_2$، dNTP، بافر، آغازگر (Primer) و آب و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. ترادف آغازگرهای به‌کار رفته به شرح زیر است:

NS انسانی (NM_014366)

CAGCAGCAGAAACTTGACAG: جلویی و

CCTTCACACGCTTGGTTATC: برگشتی

قطعه حاصل از PCR با این جفت آغازگر برابر با ٤٣٩ جفت باز است.

β2m انسانی (NM_004048)

CTACTCTCTCTTTCTGGCCTG: جلویی و

GACAAGTCTGAATGCTCCAC: برگشتی

قطعه حاصل از PCR با این جفت آغازگر برابر با ۱۹۰ جفت باز است.

میزان بیان ژن β2m (β2 microglobulin) به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) عکس‌برداری شدند.

۲-٤- ایمونوسیتوشیمی

برای انجام ایمونوسیتوشیمی، ابتدا سلول‌ها روی لامل‌های پوشانده شده با کلاژن کشت داده شده و پس از انجام تیمارهای مورد نظر، ٤٨ ساعت پس از ترانسفکشن با محلول پارافرمالدهید ٤ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شدند. پس از طی مراحل نفوذپذیرسازی، غیرفعال کردن پراکسیدازهای داخلی و مهار اتصالات غیراختصاصی با کمک BSA (Bovine Serum Albumin)، با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی NS (R&D system) و سپس با آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) (Abcam) انکوبه و در نهایت علایم با استفاده از DAB (Diaminobenzidine) شناسایی شدند.

۲-۵- وسترن بلاتینگ

پروتئین تام سلولی با استفاده از محلول RIPA (Radioimmuno-precipitation Assay Buffer) استخراج شده و پس از الکتروفورز در ژل (۱۲درصد) SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis) به روی کاغذ PVDF (Polyvinylidene Fluoride) (Amersham) منتقل شد. پس از مرحله انتقال، غشای PVDF به‌مدت ۲ ساعت در محلول مسدودکننده (Blocking solution) (ECL advanced kit, Amersham)، در دمای اتاق انکوبه شد و سپس به‌مدت ۵ ساعت با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی NS (R&D system) و سپس با آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP (Abcam) به‌مدت یک ساعت انکوبه و در نهایت علایم با استفاده از محلول ECL advanced kit (Amersham) شناسایی شدند. غشای مذکور سپس با آنتی بادی بر علیه بتا- اکتین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

(β-actin) (Abcam) انکوبه شد تا از میزان یکسان بارگذاری (loading) پروتئین‌ها در ژل اطمینان حاصل شود.

۲-۶- آنالیز رشد سلولی

۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، سلول‌ها با کمک تریپسین (Trypsin) جداسازی و با استفاده از لام هموسیتومتر (Haemocytometer) شمارش شدند.

۲-۷- بررسی چرخهٔ سلولی

سلول‌ها ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، تریپسینه شده و با اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند. سپس در محلول ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروپیدیوم آیودید (Propidium Iodide) (Sigma) حاوی RNAse A (Fermentas) به‌مدت نیم‌ساعت انکوبه شد و با کمک دستگاه فلوسیتومتر (Flocytometer) (Becton Dickinson) آنالیز و نتایج با نرم‌افزار WIN-MDI ویرایش ۲/۸ تفسیر شد.

۲-۸- بررسی رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول

۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌ها تریپسینه شده و پس از شستشو با PBS، در ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنکسین V-FITC دای (Annexin V-FITC dye) حاوی پروپیدیوم آیودید و بافر متصل‌شونده (Roche) به‌مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از افزودن ۴۰۰ میکرولیتر دیگر از بافر متصل شونده، درصد سلول‌های آنکسین V-FITC مثبت و پروپیدیوم آیودید منفی (که نمایانگر سلول‌ها در مراحل اولیه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است) و درصد سلول‌های آنکسین V-FITC و پروپیدیوم آیودید مثبت (که نمایانگر سلول‌ها در مراحل انتهایی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است) با کمک دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson) و نرم‌افزار WIN-MDI ویرایش ۲/۸ تعیین شد.

۳- نتایج

۳-۱- بیان ژن *NS* در رده سلولی 5637

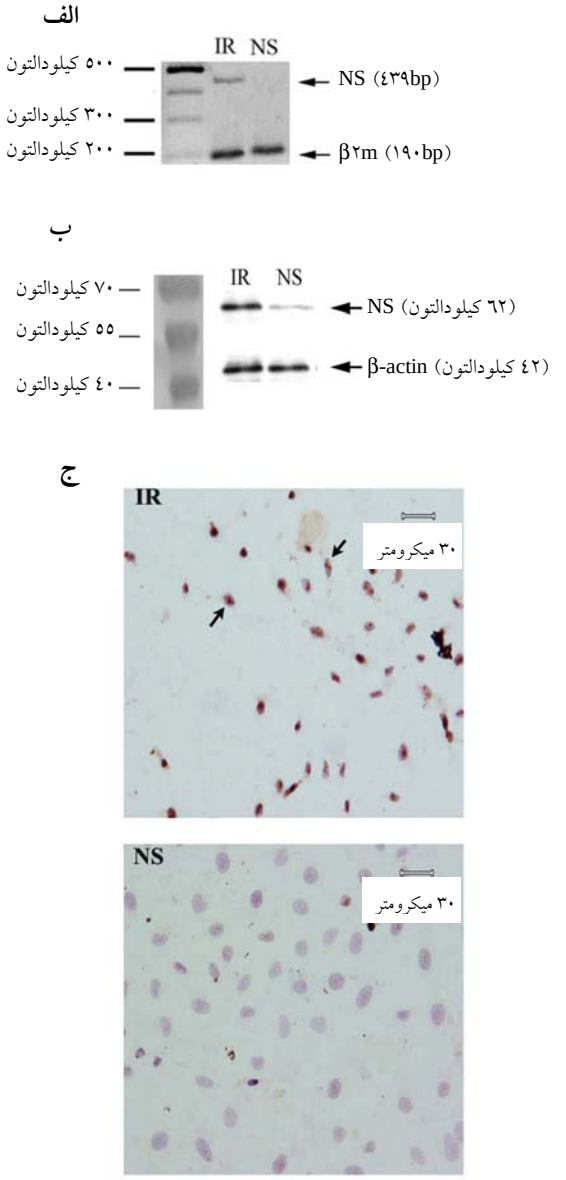
ژن *NS* به عنوان یکی از ژن‌های تنظیم‌کننده خودبازسازی سلول‌های بنیادین پیشنهاد شده است [۲]. با توجه به مدل سلول بنیادی برای سرطان، احتمال بیان این ژن در رده سلولی 5637 که مشتق شده از کارسینومای مثانه است، بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده بیان بالای ژن *NS* در این رده سلولی بود (شکل ۱الف). وسترن بلات نیز تأییدکننده بیان پروتئین NS با اندازه تقریبی حدود ۶۰ کیلودالتون بود (شکل ۱ب). علاوه بر این، به‌کارگیری روش ایمونوسیتوشیمی نیز نشان داد که *NS* در سطح پروتئین و در هستک سلول‌های مذکور بیان می‌شود (شکل ۱ج).

۳-۲- مهار اختصاصی ژن *NS* بعد از تیمار با siRNA

به‌منظور بررسی آثار غیراختصاصی احتمالی فرآیند RNAi، از دو گروه کنترل استفاده شد؛ به‌طوری‌که علاوه بر siRNA اختصاصی بر علیه ژن *NS*، از یک IR-siRNA و نیز یک گروه بدون هیچ‌گونه تیمار (C) استفاده شد. بررسی و مقایسه بیان ژن‌های متفاوت در هر سه گروه نشان داد که تیمار با الیگونوکلئوتید آثار غیراختصاصی قابل توجهی را سبب نمی‌شود. با این حال بررسی بیان ژن *NS* با روش RT-PCR نیمه‌کمی و پس از تیمار با الیگونوکلئوتید اختصاصی در حدود ۸۵ درصد کاهش در سطح بیان *NS* mRNA را نشان داد (شکل ۱الف).

به‌منظور مطالعه اثر تغییرات کاهش در بیان mRNA سلولی ژن *NS* روی میزان بیان پروتئین NS، از روش وسترن بلات استفاده شد. نتایج وسترن بلات نشان دادند که در گروه IR باندی در حدود ۶۰ کیلودالتون که معادل با وزن مولکولی پروتئین NS است، مشاهده می‌شود. اما در گروه NS در همان محدوده تنها یک باند بسیار ضعیف وجود دارد که بیانگر کاهش میزان بیان این پروتئین در اثر تیمار با siRNA اختصاصی NS است. این در حالی است که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در شدت باند بتا- اکتین (به اندازه ۴۲ کیلودالتون) در دو نمونه مشاهده نمی‌شود که بیانگر تساوی در میزان بارگذاری پروتئین‌ها در دو چاهک است (شکل ۱ب). علاوه بر این، نتایج بررسی ایمونوسیتوشیمی نشان داد که در تعداد کمی از سلول‌های گروه NS در مقایسه با گروه IR، علایم هستکی قابل مشاهده‌اند. این موضوع می‌تواند نشانگر آن باشد که در سلول‌های ترانسفکت شده با NS-siRNA، بیان پروتئین NS نیز به‌شدت کاهش یافته است (شکل ۱ج).

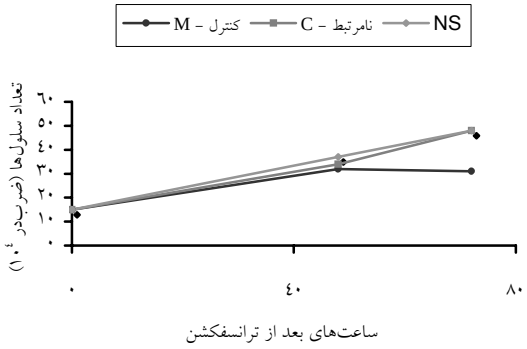
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]



شکل ۱ کاهش بیان ژن *NS* ٤٨ ساعت پس از مهار با NS-siRNA. (الف) بررسی بیان mRNAی NS با روش RT-PCR در دو گروه NS-siRNA (NS) و Irrelevant-siRNA (IR) . ژن *β2m* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است. (ب) بررسی بیان پروتئین NS با روش وسترن بلات پس از مهار. ژن بتا- اکتین به عنوان کنترل میزان بارگذاری پروتئین در نظر گرفته شده است. (ج) بررسی بیان و جایگاه درون سلولی پروتئین NS با روش ایمونوسیتوشیمی.

۳-۳- مطالعه مقایسه‌ای نرخ تکثیر سلولی

مقایسه شمارش سلول‌ها در زمان‌های ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، نشان داد که تعداد سلول‌ها در دو گروه IR و C در زمان ٧٢ ساعت، از گروه NS پیشی می‌گیرد (شکل ۲). به‌طوری‌که پس از گذشت ٧٢ ساعت از ترانسفکشن، تعداد سلول‌ها در دو گروه IR و C به میزان ٢٦ درصد بیش از گروه NS است. داده‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS و براساس آزمون آماری آنووا (Anova) بررسی شد و مشخص شد که تفاوت به‌دست آمده از لحاظ آماری نیز معنی‌دار است.



شکل ۲ نمودار رشد سلولی در گروه هایNS، IR و C، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از ترانسفکشن الیگونوکلئوتیدها.

۳-٤- مطالعه تغییرات در چرخه سلولی در پی مهار بیان *NS*

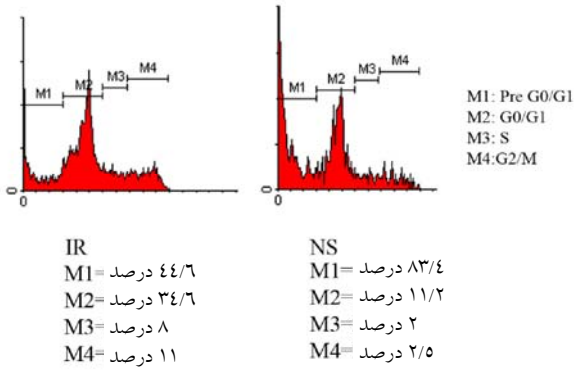
نتایج تحلیل چرخه سلولی با دستگاه فلوسیتومتری نشان‌دهنده آن بود که اختلال در بیان ژن *NS*، سبب تغییر در الگوی توزیع سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه می‌شود (شکل ۳). بر این اساس مشخص شد که در ساعت ٧٢ پس از مهار، میزان سلول‌های موجود در مرحله pre-G1 که نمایانگر رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است [۱۰]، از ٤٤/٦ درصد در گروه IR به ٨٤/٣ درصد در گروه NS افزایش یافته است. با این حال تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مورد سایر مراحل چرخه بین دو گروه IR و NS مشاهده نشد (شکل ۳).

۳-۵- تأیید رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول پس از مهار بیان ژن *NS*

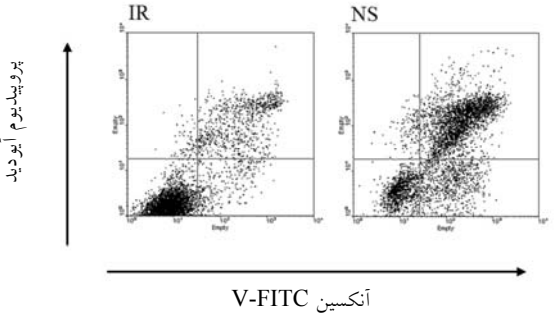
داده‌های حاصل از آنالیز چرخه سلولی، بیانگر رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول پس از مهار بیان ژن *NS* بود. از آنجایی که به‌هم خوردن نامتقارنی غشای سلول‌ها و در معرض

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

قرارگیری فسفاتیدیل سرین، یکی از نشانه‌های اولیه وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است [۱۱]، بنابراین به‌منظور تأیید وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در پی مهار *NS*، سلول‌ها در دو گروه NS و IR با رنگ‌های اختصاصی آنکسین V-FITC و پروپیدیوم آیودید، تیمار شدند. درصد سلول‌های آنکسین V-FITC مثبت و پروپیدیوم آیودید منفی (که نمایانگر سلول‌ها در مراحل اولیه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است) در گروه IR و NS به‌ترتیب ۸ و ۱۸ درصد و میزان سلول‌های آنکسین V-FITC و پروپیدیوم آیودید مثبت (که نمایانگر سلول‌ها در مراحل انتهایی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است) در دو گروه IR و NS به‌ترتیب ۱۸ و ۵۵ درصد بود (شکل ٤). نتایج بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول به‌وضوح نشان داد که مهار بیان ژن *NS* در رده سلولی 5637 منجر به وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود.



شکل ۳ آنالیز چرخهٔ سلولی. توزیع و درصد سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه در گروه‌های تیمار شده با الیگو نوکلئوتیدهای NS و IR.



شکل ٤ آنالیز رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با انجام آزمون اختصاصی رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آنکسین V-FITC و پروپیدیوم آیودید.

٤- بحث

یک توده توموری می‌تواند به‌عنوان یک بافت غیرمعمول در نظر گرفته شود که به‌وسیله یک سلول سرطانی تومورزا (Tumorigenic) آغاز شده است؛ به‌طوری که این سلول توانایی تکثیر نامحدود را به‌وسیله تجمع جهش‌ها پیدا کرده است. وقتی تومور را به‌عنوان یک بافت غیرطبیعی در نظر بگیریم، اصول زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی طبیعی می‌تواند برای فهم بهتر توسعه و رشد تومور به‌کار رود [۱۲-۱٤].

یکی از مسائل مهم در زیست‌شناسی سلول‌های بنیادین، فهم مکانیسم‌های مربوط به تنظیم خودبازسازی است. خودبازسازی نوعی از تقسیم سلولی است که در آن یک یا هر دوی سلول‌های دختری حاصل، به‌صورت غیرمتمایز باقی مانده و توانایی ایجاد یک سلول بنیادی دیگر با همان توانایی تکثیر نظیر سلول مادری را دارد. تکثیر (Proliferation)، برخلاف خودبازسازی نه نیاز دارد که سلول‌های دختری، سلول بنیادین باشند و نه این‌که توانایی ایجاد یک زاده تمایزیافته را داشته باشند [۱۵]. بنابراین تکثیر و خودبازسازی معادل هم نیستند، اما تکثیر بخشی از فرآیند خودبازسازی محسوب می‌شود. مدل جدید برای توجیه سرطان که تحت عنوان «مدل سلول بنیادی برای سرطان» است، پیشنهاد می‌نماید که سلول‌های سرطانی تومورزا، فرایندهایی را متحمل می‌شوند که مشابه فرایند خودبازسازی و تمایز سلول‌های بنیادی طبیعی است. به‌عبارت دیگر، سلول‌های تومورزا می‌توانند به‌عنوان سلول بنیادی سرطانی (Cancer stem cells) در نظر گرفته شوند. علی‌رغم اهمیت فرآیند خودبازسازی در سلول‌های بنیادی طبیعی و نیز در سرطان، هنوز نحوه تنظیم این واقعه کاملاً مشخص نشده است [۱٦]. فهرست ژن‌هایی که نقش آن‌ها در خودبازسازی سلول‌های بنیادین مختلف گزارش می‌شود، روز به روز در حال گسترش است؛ از میان این ژن‌ها می توان به *Oct3/4*، *Nanog*، *Bmi-1* و... اشاره نمود. با این حال نقش دقیق و مکانیسم‌های عملکردی اغلب این ژن‌ها به‌خوبی مشخص نشده است [۱۷-۱۹].

NS، یکی از ژن‌های دخیل در فرآیند خودبازسازی است که اولین بار در سال ۲۰۰۲ شناسایی شد [۲]. بیان بالایی از این ژن در سلول‌های بنیادین سیستم عصبی مرکزی، خون‌ساز،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

مزانشیمال مغز استخوان و... گزارش شده است [۲،٤-٦]. علاوه بر این، بیان آن در انواع مختلف رده‌های سلولی و بافت‌های سرطانی مشاهده شده است [۳-۹]. مطالعات روی سرکوب بیان این ژن هم در سلول‌های بنیادین و هم در رده‌های سلولی سرطانی صورت پذیرفته است [۷،٦،۳،۲]، ولی تاکنون نقش این ژن در سرطان مثانه و رده‌های سلولی مشتق شده از آن بررسی نشده است.

در مطالعهٔ حاضر، بیان بالقوه ژن *NS* در رده سلولی سرطانی مثانه 5637 بررسی شد و به‌منظور بررسی نقش این ژن، استراتژی RNAi برای سرکوب بیان *NS* به‌کار گرفته شد. نتایج، بیانگر بیان ژن *NS* به میزان بالایی در این رده سلولی بود. علاوه بر این، به‌کارگیری روش ایمونوسیتوشیمی نیز نشان داد که *NS* در سطح پروتئین و در هستک سلول‌های مذکور بیان می‌شود. وسترن بلاتینگ نیز مجدداً تأییدکننده بیان پروتئین NS با اندازه تقریبی حدود ٦۰ کیلودالتون بود. این یافته در راستای مطالعات قبلی مبنی بر بیان NS در رده‌های سلولی سرطانی متنوع نظیر رده سلولی سرطانی معده (SGC-7901)، رده سلولی سرطانی هپاتوکارسینوما (HepG2)، رده سلولی سرطانی دهانه رحم (Hela)، رده سلولی سرطانی سینه (MMK-7)، رده‌های سلولی پروستات و... است [۷،۳]. جایگاه درون سلولی *NS* در هسته و به‌طور دقیق‌تر در هستک است، درحالی‌که برخی محققان، بیان *NS* را علاوه بر هسته در سیتوپلاسم نیز گزارش نموده‌اند [۷، ۸، ۲۰]، با این حال در مطالعه حاضر، علامت مربوط به پروتئین NS، تنها درون هستک رده سلولی سرطانی مثانه 5637 مشاهده شد. پس از تأیید بیان، ژن *NS* با استفاده از الیگونوکلئوتید اختصاصی بر علیه آن (siRNA) با موفقیت مهار شد. بررسی نیمه‌کمی بیان *NS* پس از مهار، بیانگر کاهشی در حدود ۸۵ درصد در سطح mRNA بود. این یافته با انجام وسترن بلات و ایمونوسیتوشیمی در سطح پروتئین نیز تأیید شد.

مهار ژن *NS* در رده سلولی سرطانی مثانه 5637، منجر به کاهش شدید در نرخ تکثیر سلول‌ها شد، به‌طوری که تعداد سلول‌ها در گروه تیمار شده با الیگونوکلئوتید اختصاصی بر علیه ژن *NS* کاهشی ۲٦ درصدی نسبت به گروه‌های کنترل نشان داد. مهار ژن *NS* در رده سلولی سرطانی پروستات (PC3)، دهانه رحم (Hela)، استئوسارکوما (Osteosarcoma) (U2OS) و سلول‌های مزانشیمی بنیادین مغز استخوان موش صحرایی نتایج مشابهی از نظر کاهش نرخ تکثیر سلولی نشان داده است [۲۱،۸،۷]. با این حال، در مطالعه‌ای توسط کافینه (Kafienah) و همکاران با سرکوب بیان ژن *NS* در سلول‌های مزانشیمی بنیادین مغز استخوان انسان، تغییر قابل ملاحظه‌ای در نرخ تکثیر سلولی مشاهده نشد [۲۲]. این یافته می‌تواند با تفاوت‌های ذاتی این رده سلولی با دیگر انواع رده‌های سلولی سرطانی و سلول‌های مزانشیمی بنیادین مغز استخوان موش صحرایی یا تفاوت در طراحی آزمایش‌ها قابل توجیه باشد.

نتایج آنالیز چرخه سلولی با دستگاه فلوسیتومتری، نشان‌دهنده آن بود که اختلال در بیان ژن *NS* سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در میزان سلول‌های موجود در مرحله pre-G1، که نمایانگر رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است، می‌شود. با این حال، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مورد سایر مراحل چرخه بین دو گروه IR و NS مشاهده نشد. رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با انجام آزمون اختصاصی رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آنکسین V-FITC مجدداً تأیید شد.

مطالعات قبلی در زمینه سرکوب بیان ژن *NS* در رده‌های سلولی مختلف، مهار و توقف چرخه سلولی در مرحله G0/G1 را گزارش نموده‌اند [۷،٦،۳]. اما در مطالعه حاضر، چنین نتیجه‌ای حاصل نشد که علت احتمالی آن می‌تواند در تفاوت ذاتی رده سلولی مورد آزمایش با دیگر مطالعات باشد. به‌خصوص با مدنظر داشتن این‌که رده سلولی سرطانی مثانه 5637، فاقد مهم‌ترین پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی، یعنی p53 و Rb (Retinoblastoma) است [۲٤،۲۳].

مهار ژن *NS* در رده سلولی مذکور، منجر به القای شدید مرگ برنامه‌ریزی شده سلول شد. تاکنون تنها در یک مطالعه با استفاده از رده سلولی سرطانی پروستات (PC3)، وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلول پس از مهار *NS* گزارش شده است [۷]. با توجه به فقدان پروتئین p53 در رده سلولی سرطانی مثانه 5637 و نیز رده سلولی سرطانی پروستات PC3، رخداد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول پس از مهار *NS* احتمالاً از طریق مسیرهای غیروابسته به p53 انجام می‌گیرد. مطالعات اولیه، مفروض به وابستگی عملکرد ژن *NS* با پروتئین p53 بود [۲]، با این حال مشاهده تغییرات فنوتیپی مشابه نظیر کاهش نرخ تکثیر سلولی پس

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

از مهـار *NS* در سـلول‌هـای واجـد و فاقـد پـروتئین p53 عملکـردی، فرضـیه عـدم وابـستگی عملکـردی ژن *NS* بـا پروتئین p53 را قوت می‌بخشد [۳،۷].

مطالعه حاضر برای اولین بـار، نـشان داد کـه پـروتئین NS نقش مهمی در تنظیم تکثیر و مرگ برنامه‌ریزی شده سـلول رده سلولی سرطانی مثانه 5637 ایفا می‌کند و بـا توجـه بـه فقـدان پروتئین p53 در این رده سلولی، این فرضـیه کـه عملکـرد ژن *NS* می‌تواند از مسیرهای غیر وابسته به پروتئین p53 نیز تنظیم شود، قوت می‌گیرد. بررسی بیان و عملکرد دیگر ژن‌های درگیر در خودبازسازی سلول‌های بنیادی طبیعی یا توموری، می‌توانـد در آینده راه‌گشای روش‌های تشخیص و درمان سرطان مثانـه و دیگر سرطان‌ها شود.

۵- منابع

[1] Al-Hajj M ,Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene 2004; 23(43): 7274-82.

[2] Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes Dev 2002; 16(23): 2991–3003.

[3] Sijin L, Ziwei C, Yajun L, Meiyu D, Hongwei Z, Guofa H, Siguo L, Hong G, Zhihong Z, Xiaolei L, Yingyun W, Yan X, Weide L. The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the in vitro proliferation and in vivo tumorigenesis of HeLa cells. J Exp Clin Cancer Res 2004; 23(3): 529-38.

[4] Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. Rejuvenation Res 2008; 11(2): 379-86.

[5] Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. Neurosci Lett 2005; 390(2): 81-6.

[6] Jafarnejad SM, Mowla SJ, Matin MM. Knocking-down the expression of nucleostemin significantly decreases rate of proliferation of rat bone marrow stromal stem cells in an apparently p53-independent manner. Cell Prolif 2008; 41(1): 28-35.

[7] Liu RL, Zhang ZH, Zhao WM, Wang M, Qi SY, Li J, Zhang Y, Li SZ, Xu Y. Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. Chin Med J (Engl) 2008; 121(4): 299-304.

[8] Fan Y, Liu Z, Zhao S, Lou F, Nilsson S, Ekman P, Xu D, Fang X. Nucleostemin mRNA is expressed in both normal and malignant renal tissues. Br J Cancer 2006; 94(11): 1658-62.

[9] Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, Wei YY, Lao WD. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. World J Gastroenterol 2004; 10(9): 1246-9.

[10] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 1991; 139(2): 271–9.

[11] Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 1992; 148(7): 2207–16.

[12] Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. Science 2000; 287(5457): 1442-6.

[13] Morrison SJ, Shah NM , Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

Cell 1997; 88(3): 287-98.

[14] Kummermehr J, Trott KR, Potten CS(ed.). In Stem Cells . New York, Academic, 1997; p: 363-99.

[15] Clarke MF. Self-renewal and solid-tumor stem cells, Biology of Blood and Marrow. Transplantation 2005; 11: 14-16.

[16] Molofsky AV, Pardal R,,Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. Curr Opin Cell Biol 2004; 16(6): 700-7.

[17] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor oct4. Cell 1998; 95(3): 379–91.

[18] Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 2003; 113(5): 643–55.

[19] Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. Nature 1999; 397(6715): 164–8.

[20] Yang H, Zhang J, Wu J, Shou C. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against nucleostemin, a protein that controls cell proliferation in stem cells and cancer cells. Hybridoma (Larchmt) 2005; 24(1): 36-41.

[21] Dai MS, Sun XX, Lu H. Aberrant expression of nucleostemin activates p53 and induces cell cycle arrest via inhibition of MDM2. Mol Cell Biol 2008; 28(13): 4365-76.

[22] Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. Stem Cells 2006; 24(4): 1113-20.

[23] Nixdorf S, Grimm MO, Loberg R, Marreiros A, Russell PJ, Pienta KJ, Jackson P. Expression and regulation of MIM (Missing In Metastasis), a novel putative metastasis suppressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. Cancer Lett 2004; 215(2): 209–20.

[24] Schnier JB, Nishi K, Goodrich DW, Bradbury EM. G1 arrest and down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 by the protein kinase inhibitor staurosporine are dependent on the retinoblastoma protein in the bladder carcinoma cell line 5637. Proc Natl Acad. Sci USA 1996; 93(12): 5941-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]