



Effect of miR-579 overexpression on the BAX and CDKN1A genes in the Glioblastoma cell line

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Kalhari M.R.¹ MSc,
Irani Sh.¹ PhD,
Soleimani M.*² PhD,
Arefian E.³ PhD,
Kouhkan F.⁴ PhD

How to cite this article

Kalhari M.R, Irani Sh, Soleimani M, Arefian E, Kouhkan F. Effect of miR-579 overexpression on the BAX and CDKN1A genes in the Glioblastoma cell line. Pathobiology Research. 2019;22(1):27-34.

ABSTRACT

Aims Glioblastoma multiforme is a type of brain cancers that do not respond well to treatment. The poor prognosis of this disease is due to the presence of radiation resistance and chemotherapy. The purpose of the present study was to produce miR-579 precursor carriers and investigate the effect of increased expression of miR-579 on the expression of BAX and CDKN1A genes in the glioblastoma cell line.

Materials & Methods In this experimental study, in order to produce recombinant lentiviral vectors, a gene containing the miR-579 precursor sequence was cloned into pCDH the plasmid. The recombinant structure was transmitted to the cells of HEK293T with psPAX and pMD2 plasmids. Viral particles were concentrated using Ultra Centrifuge. Viral titration was calculated by flow cytometry. The viral particles produced were transferred to the A-172 cell line. Finally, by using Real-Time PCR, changes in expression levels of miR-579 and BAX and CDKN1A genes were investigated.

Findings The presence of miR-579 gene precursor in the plasmid was confirmed by colony PCR and sequencing methods. The study showed that the level of miR-579 expression in infected cells with the recombinant virus was found to be up-regulated seven-fold compared to the control group. miR-579 increased the BAX gene expression by three times. But, there was no significant change in the expression of CDKN1A gene expression.

Conclusion Increased expression of miR-579 in the A-172 cell line could increase the expression of BAX gene. However, the CDKN1A gene expression does not change significantly.

Keywords miR-579; Glioblastoma; CDKN1A; BAX

¹Biology Department, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Hematology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Microbiology Department, Biology Faculty, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴Molecular Biology & Genetic Engineering Department, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran

Phone: +98 (21) 82884508

Fax: -

soleim_m@modares.ac.ir

Article History

Received: February 13, 2018

Accepted: March 6, 2018

ePublished: March 11, 2019

CITATION LINKS

[1] Genetic pathways to primary and secondary ... [2] Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations ... [3] MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival ... [4] MicroRNAs involved in the EGFR/PTEN/AKT ... [5] Two new miR-16 targets: Caprin-1 and HMGA1 ... [6] miR-15a and miR-16-1 in cancer: Discovery, function ... [7] Extensive modulation of a set of microRNAs ... [8] MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human ... [9] A systematic review of microRNA in glioblastoma ... [10] MicroRNAs and their impact on radiotherapy ... [11] miR-579-3p controls melanoma progression ... [12] Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis ... [13] Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial ... [14] Bax-induced apoptotic cell ... [15] p21 in cancer: Intricate networks and multiple ... [16] Expression of Ferritin light chain (FTL) is elevated in Glioblastoma, and FTL ... [17] miR-93 suppresses proliferation and colony formation ... [18] Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted ... [19] MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis ... [20] Molecular markers in clinical radiation ... [21] Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor ... [22] Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery ... [23] miR-511 induces the apoptosis of radioresistant lung ...

تاثیر افزایش بیان miR-579 بر ژن‌های BAX و CDKN1A در رده سلولی گلیوبلاستوما

محمدرضا کلهری MSc

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

شیوا ایرانی PhD

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مسعود سلیمانی PhD*

گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

احسان عارفیان PhD

گروه میکروبی‌شناسی، پردیس علوم پایه، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

فاطمه کوهکن PhD

گروه بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته، تهران، ایران

چکیده

اهداف: گلیوبلاستوما مولتی‌فرم یکی از انواع سرطان‌های مغزی است که پاسخ مناسبی به درمان نشان نمی‌دهد. پیش‌آگهی بد این بیماری به دلیل وجود حالت مقاومت به پرتو و شیمی‌درمانی است. هدف مطالعه حاضر تولید ویروس لنتی حامل پیش‌ساز miR-579 و بررسی تاثیر افزایش بیان miR-579 بر بیان ژن‌های BAX و CDKN1A در رده سلولی گلیوبلاستوما بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر برای تولید ویروس لنتی نوترکیب قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-579 در پلاسمید pCDH همسانه‌سازی شد. سازه نوترکیب به همراه پلاسمیدهای psPAX و pMD2 به سلول‌های HEK293T انتقال داده شد. ذرات ویروسی با روش اولتراسانتریفیوژن تغلیظ شدند. تیترو ویروسی با روش فلوسایتومتري محاسبه شد. ذرات ویروسی تولیدشده به دومان سلولی A-172 انتقال داده شدند. در نهایت با بهره‌گیری از روش PCR در زمان واقعی تغییرات سطوح بیانی miR-579 و ژن‌های BAX و CDKN1A بررسی شدند.

یافته‌ها: حضور پیش‌ساز ژن miR-579 در پلاسمید با کمک روش‌های کلونی PCR و توالی‌یابی مورد تایید قرار گرفت. بررسی‌ها نشان دادند که سطح بیان miR-579 در سلول‌های آلوده شده با ویروس نوترکیب در مقایسه با گروه کنترل افزایش هفت‌برابری یافت. افزایش بیان miR-579 منجر به افزایش بیان ژن BAX تا سه‌برابر شد، اما در مقابل تغییر معنی‌داری در بیان ژن CDKN1A مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان miR-579 در رده سلولی A-172 می‌تواند بیان ژن BAX را افزایش دهد اما در بیان ژن CDKN1A تغییر معنی‌داری ایجاد نمی‌کند. **کلیدواژه‌ها:** miR-579، گلیوبلاستوما، BAX، CDKN1A

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۵

*نویسنده مسئول: soleim_m@modares.ac.ir

مقدمه

گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (GBM) یکی از انواع سرطان‌های مغزی است که حدوداً ۱۲ تا ۱۵٪ تومورهای مغزی و ۷۰٪ موارد گلیوما را به خود اختصاص داده است. براساس طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی به آن گرید IV گلیوما اطلاق می‌شود. پیش‌آگهی بد این بیماری (متوسط؛ میزان بقا کمتر از ۱۵ ماه) اکثراً به دلیل وجود حالت مقاومت به پرتو و شیمی‌درمانی است. نام گلیوبلاستوما مولتی‌فرم برگرفته از وجود حالت ناهمگنی (هتروژنیته) بالای سلول‌های این نوع تومور است. این ناهمگنی هم از نظر مولکولی و هم از نظر ناهنجاری‌های کروموزومی مورد توجه است [1, 2]. تومورهای GBM از نظر منشا ایجاد به دو نوع اولیه یا دنوآ و ثانویه تقسیم می‌شوند. شایع‌ترین نوع این تومورها نوع اولیه آن

است که ۹۰٪ موارد ابتلا را شامل می‌شود. تکثیر قطعه ژنی یا افزایش بیان EGFR در ۵۰٪ موارد آن دیده می‌شود. این در حالی است که تومورهای ثانویه تنها ۱۰٪ موارد ابتلا را شامل می‌شوند و دچار جهش در ژن‌های p53، PDGFR و RB هستند [3]. براساس مطالعات صورت‌گرفته فرآیندهای مولکولی موثر در پیشبرد گلیوبلاستوما سه دسته هستند. دسته اول شامل افزایش بیان یا تکثیر قطعه ژنی EGFR است به طوری که افزایش بیان این پروتئین با پیش‌آگهی بد بیماران مرتبط است زیرا EGFR در ایجاد حالت مقاومت به درمان (شیمیایی-پرتو) نقش دارد. بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی مطلوب به حساب آید. دسته دوم شامل ازدست‌رفتن ژن سرکوب‌کننده تومور بنام PTEN است که اولین بار در سال ۱۹۹۷ شناسایی شد و در دفسفاته‌کردن PIP3 نقش دارد. این نوع جهش در بیشتر تومورهای اولیه رایج بوده و با افزایش مقاومت به درمان (شیمیایی-پرتو) مرتبط است. دست دوم سوم این فرآیندها به فعال شدن مسیر PI3K-AKT مرتبط است. سلول‌های گلیوما سطح بالایی از فعالیت AKT را نشان می‌دهند که با افزایش فعالیت PI3K و مقاومت به درمان مرتبط است [4]. RNAهای مداخله‌کننده، RNAهای کوچک غیرکدکننده‌ای شامل microRNA و siRNA هستند که در امر تنظیم بیان ژن‌ها در مرحله بعد از رونویسی فعالیت دارند [5]. microRNAها در واقع RNAهایی هستند که بیان ژن‌ها را از طریق هدف قراردادن ناحیه 3' ترجمه‌نشونده mRNA آنها تنظیم می‌کنند. با این عملکرد یا موجب تخریب mRNA یا مانع ترجمه آن می‌شود. در نتیجه از بیان ژن ممانعت نموده و میزان پروتئین ژن هدف را کاهش می‌دهند. miRNAها با این عمل خود سبب تنظیم فعالیت‌های بیولوژیکی سلول همچون تکثیر، تمایز، متابولیسم، مرگ برنامه‌ریزی شده و پیری می‌شوند [6].

اولین مطالعه در خصوص ارتباط miRNAs با سرطان گلیوبلاستوما در سال ۲۰۰۵ به وسیله سیافر و همکاران صورت گرفت. آنها به وسیله فناوری میکروآرایه پروفایل بیانی miRNAها را در GBM بررسی کردند. آنها نشان دادند که بیان miRNAها در بافت توموری از بافت نرمال گلیوبلاستوما متفاوت است؛ بنابراین می‌توان از این مولکول‌ها در آینده به‌عنوان یک روش قدرتمند و مفید در درمان این بیماری استفاده کرد [7]. سپس چان و همکاران عملکرد مولکولی miR-21 را در یک رده سلولی GBM را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که با مهار بیان این miRNA وقوع مرگ برنامه‌ریزی شده در این سلول‌ها افزایش می‌یابد [8]. در یک مطالعه سامانمند که به وسیله مولر صورت گرفت، مشخص شد که در تومورهای بیماران مبتلا به این سرطان در مقایسه با بافت نرمال گلیوبلاستوما حدود ۲۵۶ عدد miRNA تغییر بیان (بعضی‌ها افزایش و بعضی دیگر کاهش بیان) یافتند که علاوه بر نقش آنها در ایجاد تومور و تولید سرطان در تعیین چگونگی پاسخ بیماران به درمان نیز می‌توان از آنها بهره برد [9]. از آنجایی که یکی از مکانیسم‌های مقاومت به پرتو یا شیمی‌درمانی قدرت و کارایی سیستم ترمیم DNA است می‌توان گفت که miRNAها قادر هستند بیان پروتئین‌های دخیل در این مکانیسم را تغییر دهند و منجر به تغییر پاسخ سلول‌های سرطانی به درمان کمکی سرطان شوند. افزایش بیان miR-7 منجر به کاهش بیان EGFR و کاهش فسفریلاسیون DNA-PK و در نتیجه سبب افزایش حساسیت سلول‌ها به پرتو می‌شود. همچنین در رده‌های سلولی مربوط به سرطان کلورکتال مشاهده شده که افزایش بیان miR-

تکثیر قطعه ژنی miR-579 با استفاده از روش PCR: DNA ژنومی از خون کامل با استفاده از کیت ستونی GENE ALL (کره جنوبی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس به منظور تعیین غلظت DNA، ۲ میکرولیتر از نمونه را با ۹۸ میکرولیتر آب مقطر رقیق نموده و جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. دستگاه با توجه به ضریب رقت، غلظت DNA را برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص می‌نماید و خلوص DNA نیز از تقسیم جذب نوری DNA در ۲۶۰ نانومتر به جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر به دست می‌آید که میزان ایده‌آل آن باید بین ۲-۱/۸ باشد. قسمتی از توالی پیش‌ساز miR-579 (شامل ۲۵۰ جفت‌باز از فرادست و فرودست توالی بالغ میکروRNA که در ناحیه کروموزومی 5p13.3 قرار دارد از سایت اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene> دریافت، سپس آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار oligo7 (version 7.6) به گونه‌ای طراحی شدند که محصول آنها توالی بالغ miR-579 را در بر گیرد. بعد از طراحی و انتخاب آغازگرها با استفاده از سایت اینترنتی (<https://eu.idtdna.com/calc/analyser>) oligoAnalyzer 3.1 تک‌تک آغازگرها از نظر دمایی و تشکیل ساختارهای ثانویه بررسی شدند. اتصال آغازگرها به توالی‌های غیراختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم بلاست (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) و بررسی شد. توالی برش آنزیم‌های هضم‌کننده EcoR1 به انتهای ۵' آغازگر مستقیم و BamHI به انتهای ۵' آغازگر معکوس اضافه شد. محصول PCR این آغازگرها باید قطعه‌ای به طول ۴۴۸ جفت‌باز باشد. برای انجام واکنش PCR از مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۴۰ میلی‌مول)، یک میکروگرم DNA ژنومی استخراج‌شده، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۴ میکرولیتر کلریدمنیزیم (۱۰۰ میلی‌مولار) و ۰/۵ واحد از آنزیم DNA پلی‌مراز Taq (سیناژن-ایران) استفاده شد. واکنش PCR (PEQLAB, USA) با واکنش واسرشتگی اولیه DNA به مدت ۷ دقیقه در دمای ۹۵°C شروع و سپس در ۳۵ سیکل واکنش تکثیر اجرا شد (۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه) و در نهایت به مدت ۷ دقیقه در ۷۲°C پایان یافت.

همسانه‌سازی ژن miR-579 در پلاسمید pCDH: با روش همسانه‌سازی ژن قطعه ژنومی مورد نظر در پلاسمید درج شد. در مطالعه حاضر از پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP (بیوساینس؛ ایالات متحده) که حاوی کاست ژنی برای آنتی‌بیوتیک پورومایسین، آمپی‌سیلین و ژن برای بیان پروتئین فلورسنت سبز است، استفاده شد (شکل ۱). پس از استخراج پلاسمید به وسیله کیت استخراج پلاسمید MN و تعیین غلظت و خلوص آن، با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر EcoRI و BamHI (فرمنتاز؛ لیتوانی) محصول PCR و DNA پلاسمید برش داده شد. با استفاده از کیت Clean Up (MN؛ آلمان) پاک‌سازی محصول هضم صورت گرفت. واکنش اتصال توسط آنزیم T4 DNA لیگاز (فرمنتاز؛ لیتوانی) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (شکل ۱).

با استفاده از روش شوک حرارتی پلاسمید نو ترکیب به باکتری‌های مستعد /شریشیا کلی سویه DH4a انتقال داده شدند و ۹۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷°C شیکردار در محیط مایع لیزوژنی‌براث (LB) فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. کلون‌های ترانسفورم شده

100 منجر به افزایش بیان پروتئین p53 و کاسپاز ۳ و کاهش بیان *Bcl2* و *NF-KB* خواهد شد، در نتیجه حساسیت سلول‌ها را به پرتو ایجاد خواهد کرد^[10]. جایگاه miR-579 طبق سایت انسمبل (Ensemble) در ناحیه کروموزومی 5p13.3 قرار داد. در مطالعه‌ای که در سرطان ملانوما برای اولین بار روی عملکرد این miRNA صورت گرفت مشخص شد که miR-579 خاصیت مهارکننده توموری دارد و در رده‌های سلولی و بافت توموری ملانوما کاهش بیان نشان می‌دهد. به طوری که افزایش بیان آن قادر است با مهار بیان ژن *MDM2* سبب افزایش بیان ژن‌های *p53* و *p21* و موجب القای مرگ برنامه‌ریزی و توقف چرخه سلولی شود^[11].

ژن *CDKN1A* یا *p21* به عنوان یکی از ژن‌های مهارکننده *CDK* است. در سلول‌ها بیان *CDKN1A* به دو صورت قابل تنظیم است یک روش وابسته به *p53* و دیگری به صورت مستقل از *p53* رخ می‌دهد. پروتئین *CDKN1A* قادر است با مهار کمپلکس‌های مهم و پیش‌برنده چرخه سلولی سبب توقف و مهار چرخه سلولی شود. این پروتئین قادر است با مهار کمپلکس *CDK4,6/cyclinD* سبب توقف چرخه سلولی در مرحله عبور از *G1* به *S* شود. همچنین می‌تواند با مهار کمپلکس *CDK2/cyclinE* سبب مهار چرخه سلولی در مرحله گذر از *G2* به *M* شود^[12]. از جمله ژن‌هایی که در تنظیم بقا، رشد سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده نقش دارند می‌توان به ژن‌های *BAX* و *BCL2* اشاره کرد. این دو ژن عملکرد مخالف نسبت به یکدیگر دارند به طوری که محصول ژن *BAX* سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی وابسته به میتوکندری می‌شود^[13].

هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر افزایش بیان miR-579 بر بیان ژن‌های *CDKN1A* و *BAX* در رده سلولی A-172 مربوط به سرطان گلیوبلاستوما بود. در بررسی بیوانفورماتیکی صورت‌گرفته با استفاده از سایت اینترنتی GEO هیچ گزارشی مبنی بر تغییر پروفایل بیانی miR-579 در بافت توموری و رده‌های سلولی سرطان گلیوبلاستوما یافت نشد؛ اما از آنجایی که یکی از وجوه مشترک بین سرطان ملانوما و گلیوبلاستوما جهش در ژن *PTEN* است، امید است که miR-579 بتواند در رده سلولی گلیوبلاستوما با مهار بیان ژن *MDM2* و القای بیان ژن‌های *p53*، *BAX* و *p21* عملکرد مهارکننده توموری خود را نیز اعمال نماید. از آنجایی که پروتئین *P21* تنظیم‌کننده منفی چرخه سلولی است. افزایش بیان آن سبب مهار چرخه سلولی در مرحله *G1* می‌شود. پروتئین *BAX* قادر است سبب آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شود^[14, 15]. افزایش بیان هم‌زمان این دو می‌تواند در مهار سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما و ایجاد پاسخ مناسب به درمان نقش داشته باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک پژوهش تجربی است.

کشت رده‌های سلولی: رده سلولی HEK293T و رده سلولی سرطان گلیوبلاستوما A-172 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها در شرایط انکوباتور کشت سلولی با رطوبت ۹۵٪ و دی‌اکسید کربن ۵٪ در دمای ۳۷°C کشت و نگهداری شدند. برای کشت سلولی از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) گلوتامین ۲ میلی‌مولار، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین G و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (گیبکو؛ ایالات متحده) استفاده شد و هر ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض می‌شد تا به تراکم مطلوب برسند^[16].

آلوده‌سازی سلول‌های A-172 به وسیله ویروس لنتی نوترکیب (ترانس‌داکشن): به منظور آلوده‌سازی سلول‌های A-172 با ویروس نوترکیب ساخته شده، در یک فلاسک T25 تعداد 4×10^5 عدد سلول بذریاشی شد و در حالی که سلول‌ها هنوز معلق بودند، میزان 10^6 میکرولیتر ویروس تغلیظ شده ($MOI=2$) و 4 میکرولیتر پلی‌برن با غلظت 2 میکروگرم/میکرولیتر به آن اضافه شد. بعد از 48 ساعت انکوباسیون در 37°C ، میزان بیان پروتئین GFP در سلول‌های ترانسداکت شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. یک گروه سلولی به عنوان سلول آزمون در نظر گرفته شد که به وسیله ویروس حاوی miR-579 ترانسداکت شدند و گروه دوم گروه سلول‌های کنترل بودند که به وسیله ویروس لنتی miR-control ترانسداکت شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: پس از 72 ساعت از آلوده‌سازی سلول‌ها با ویروس نوترکیب و ویروس کنترل، RNA تام سلول‌های مورد نظر توسط واکنش گر RNX plus (سیناژن؛ ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج، غلظت و خلوص آن با استفاده از دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. به وسیله آغازگر حلقه-ساقه (Stem loop) اختصاصی طراحی شده cDNA مربوط به miR-579 و کنترل داخلی آن (Snord47) و همچنین با استفاده از آغازگرهای شش‌تایی تصادفی برای ژن‌های سلولی نیز cDNA ساخته شدند. در تحقیق حاضر برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA (سیناژن؛ ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

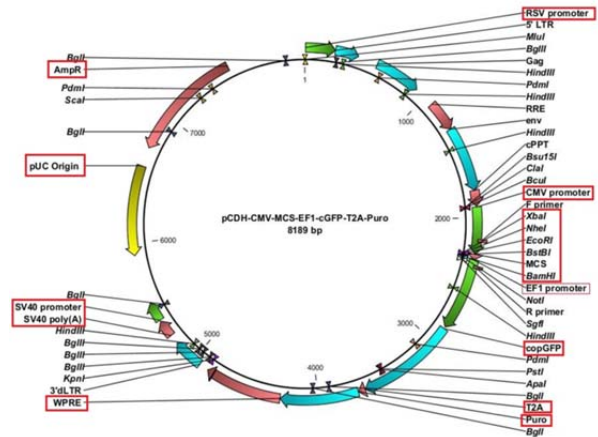
ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر توسط روش PCR در زمان واقعی: به منظور تکثیر miR-579 و snord47 واکنش PCR در زمان واقعی توسط آغازگر معکوس عمومی و آغازگر مستقیم اختصاصی انجام شد. تغییرات بیانی miR-579 در مقایسه با بیان کنترل درون‌زاد Snord47 سنجیده شد. تغییرات بیانی ژن‌های BAX و CDKN1A در مقایسه با کنترل درون‌زاد B2M با استفاده از آغازگر معکوس اختصاصی و آغازگر مستقیم اختصاصی آنها انجام شد. به منظور انجام واکنش PCR در زمان واقعی از دستگاه step one plus (ABI؛ ایالات متحده)، آغازگرها و مسترمیکس (یک‌تجهیز؛ ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. آزمایش‌ها به صورت تکرارهای سه‌تایی و در سه بار تکرار بیولوژیکی صورت گرفتند. برای هر واکنش صورت گرفته منحنی تکثیر رسم شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی تغییر بیان ژن‌های BAX، CDKN1A و miR-579 توسط روش مقایسه چرخه آستانه (CT) ژن‌های هدف در مقایسه با کنترل درون‌زاد آنها) با کمک فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد [17].

تجزیه و تحلیل‌های آماری: نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم‌افزار SPSS 19 بررسی شدند. توزیع نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون one sample k-s و $p > 0.05$ به دست آمد با استفاده از آزمون t استیویدنیت و $p < 0.05$ فرضیه مساوی بودن میانگین دو گروه سلولی بررسی شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه تکرار استوار است.

یافته‌ها

نتایج تکثیر ناحیه ژنی حاوی توالی ژن پیش‌ساز miR-579 و ترانسفورماسیون باکتری‌ها با محصول واکنش اتصال نتیجه تکثیر قطعه ژنی حاوی توالی پیش‌ساز miR-579 توسط روش PCR، طبق انتظار وجود تنها یک باند 448 جفت‌بازی روی

با استفاده از پلیت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب شدند. بعد از تایید کلونی‌های مثبت با استفاده از روش کلونی PCR به منظور حصول اطمینان از صحت توالی قطعه ژنی درج شده در ساختار پلاسمید، مقداری از پلاسمید نوترکیب استخراج شد. سپس برای توالی‌یابی به شرکت پیشگام (ایران) ارسال شد. بلاست توالی به دست آمده با استفاده از پایگاه اینترنتی انجام شد.



شکل ۱) نقشه پلاسمید pCDH-CMV-MCS-EF1-cGFP-T2A-Puro: کاست ژنی مورد نظر توسط جایگاه همسانه‌سازی چندگانه در فرودست پروموتور CMV قرار گرفته است.

انتقال سازه نوترکیب حاوی miR-579 و پلاسمیدهای کمکی به سلول‌های HEK293T و تغلیظ ذرات ویروسی: برای تولید ویروس لنتی نوترکیب حاوی miR-579 ابتدا 24 ساعت قبل از انتقال پلاسمیدهای لازم برای تولید ویروس در یک پلیت 10^6 سانتی‌متری تعداد $4/5 \times 10^6$ عدد سلول HEK293T کشت داده شد. سپس با استفاده از کیت لیپوفکتامین 2000 (اینویتروژن؛ ایالات متحده) انتقال پلاسمیدهای نوترکیب حاوی miR-579، پلاسمید psPAX2 (کدکننده پروتئین‌های ساختار ویروس)، پلاسمید pMD2 (کدکننده پروتئین‌های پوششی ویروس) به سلول‌ها طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. محیط کشت پس از 6 ساعت تعویض شد. به مدت 72 ساعت محیط کشت سلول‌ها که حاوی ویروس نوترکیب است جمع‌آوری شد. با استفاده از اولتراسانتریفیوژ ویروس‌های لنتی تغلیظ شدند و سپس در محیط DMEM فاقد FBS حل و به منظور نگهداری به فریزر -80°C انتقال داده شد.

محاسبه تیترو ویروسی با استفاده از روش فلوسایتومتری: به منظور تعیین تعداد ذرات ویروسی در یک میلی‌لیتر از ویروس تغلیظ شده، ابتدا در هر چاهک پلیت 24 خانه تعداد 7×10^4 سلول HEK293T کشت داده شد. حجم‌های مختلفی از ویروس تغلیظ شده ($1, 2, 3, 4$ میکرولیتر) به آنها اضافه شد. 72 ساعت بعد، ابتدا با استفاده از تریپسین سلول‌ها از کف پلیت کنده شدند. تریپسین با استفاده از FBS خنثی و سوپانسیون سلولی با استفاده از سانتریفیوژ در دور 1200 rpm رسوب داده شد. رسوب سلولی در مقداری PBS حل و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (ABI؛ ایالات متحده) درصد سلول‌های GFP مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از فرمول زیر تعداد ذرات ویروسی محاسبه شدند:

$$\text{Tu/ml} = \frac{\text{seeded cells} \times \% \text{GFP Positive cells}}{\mu\text{l of vector}} \times 1000$$

روش محاسبه تعداد ذرات ویروسی در یک میلی‌لیتر محیط کشت

از تعیین توالی پلاسمید نوترکیب در پایگاه اینترنتی NCBI با توالی‌های ثبت شده در آن مقایسه و مشخص شد که توالی miR-579 درج شده در پلاسمید به درستی و بدون وقوع هیچ جهشی در آن اتفاق افتاده است (شکل ۲)؛ بنابراین با اطمینان کامل می‌توان از این پلاسمید نوترکیب برای ساخت ویروس نوترکیب لنتی حاوی miR-579 استفاده کرد (شکل ۲).

ژل الکتروفورز بود که اختصاصی بودن شرایط زمانی-دمایی واکنش و آغازگرهای طراحی شده را نشان داد. پس از اینکه محصول PCR در پلاسمید pCDH توسط آنزیم‌های محدودالتر و آنزیم T4 لیگاز الحاق شد، پلاسمید نوترکیب به درون باکتری مستعد/شریشیا کلی سویه DH5α ترانسفورم شد. نتایج کلونی PCR صورت گرفته روی کلونی‌ها نشان داد که کلونینگ انجام شده است. توالی به دست آمده

Homo sapiens microRNA 579 (MIR579), microRNA

Sequence ID: [NR_030305.1](#) Length: 98 Number of Matches: 2

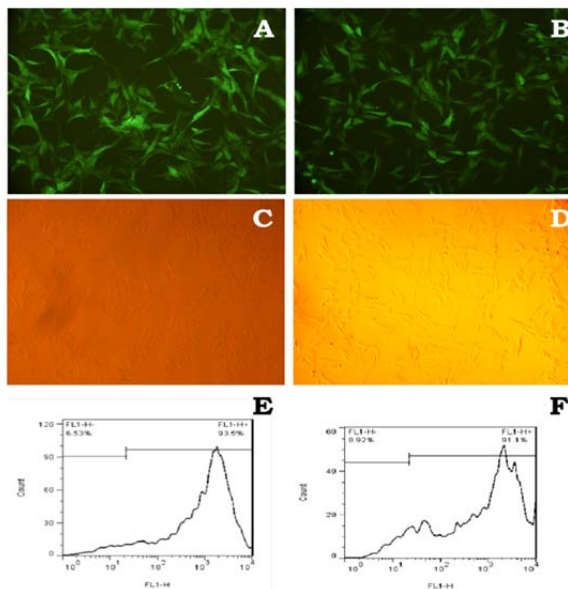
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
178 bits(196)	1e-40	98/98(100%)	0/98(0%)	Plus/Plus
Query 410	CATATTAGGTTAATGCAAAAGTAATCGCGGTTTGTGCCAGATGACGATTTGAATTAATAA	469		
Sbjct 1	CATATTAGGTTAATGCAAAAGTAATCGCGGTTTGTGCCAGATGACGATTTGAATTAATAA	60		
Query 470	ATTCATTTGGTATAAACC GCGATTATTTTTGCATCAAC	507		
Sbjct 61	ATTCATTTGGTATAAACC GCGATTATTTTTGCATCAAC	98		

شکل ۲) نتیجه بلاست توالی به دست آمده از توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب در سایت اینترنتی NCBI

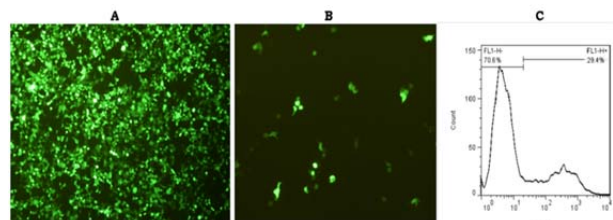
تغییر سطح بیان miR-579 پس از ترانسداکت سلول‌های A-172
پس از سپری شدن ۷۲ ساعت از ترانسداکت سلول‌های A-172 به وسیله ویروس Lenti miR-control و ویروس لنتی miR-579 بررسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که پروتئین GFP در اکثر سلول‌ها بیان شده است. همچنین نتایج بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که در بیش از ۹۰٪ سلول‌های پروتئین GFP بیان شده است که حاکی از ترانسداکت موفق سلول‌ها به وسیله ویروس بود و می‌توان تغییر بیان ژن‌ها را در آنها ارزیابی نمود (شکل ۴).

نتایج ساخت سازه ویروسی حاوی miR-579 و تعیین تیترا لنتی ویروس‌های نوترکیب

تولید ویروس نوترکیب لنتی مبتنی بر انتقال هم‌زمان پلاسمید بیانی (miR-579) و پلاسمیدهای ساختاری (psPax، pMD2) به داخل سلول‌های HEK293T و بسته‌بندی ویروس است؛ زیرا صرفاً سبزشدن سلول‌های HEK293T (شکل ۳؛ A) دلیلی بر تولید ویروس نوترکیب نیست. بعد از اینکه محیط سلولی طی ۴۸ تا ۷۲ ساعت جمع‌آوری و تغلیظ شد نیاز است تیترا ویروس و تعداد ذرات آن محاسبه شود. پس از اینکه حجم‌های مختلفی از ویروس به سلول‌های HEK293T زده شد. بعد از ۷۲ ساعت درصد سلول‌های GFP مثبت به وسیله دستگاه فلوسایتومتری محاسبه شدند (شکل ۳؛ B و C). نتایج ترانسداکت سلول‌های HEK293T با استفاده از حجم ۲ میکرولیتر از ویروس تولیدی تغلیظ شده نشان داد که ۲۹٪ سلول‌ها GFP مثبت شده‌اند که بر ساخته شدن ویروس دلالت دارد؛ زیرا ژنوم ویروس در ابتدا به صورت RNA حاوی توالی کدکننده پروتئین GFP است که بعد از تبدیل شدن به cDNA در ژنوم سلول درج و بیان شده است بنابراین سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت سبزرنگ دیده می‌شوند. با استفاده از فرمول ۱ تعداد ذرات ویروسی محاسبه شد که تیترا معادل ۹/۸ × ۱۰^۶ (Transducing Unit) داشت (شکل ۳).



شکل ۴) بررسی میزان بیان پروتئین GFP در سلول‌های A-172 بعد از گذشت ۷۲ ساعت از ترانسداکت؛ شکل A سلول‌های آلوده شده با ویروس Lenti miR-579 با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و شکل C با میکروسکوپ نوری معکوس نشان می‌دهد، شکل B سلول‌های آلوده شده با ویروس Lenti miR-control با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و شکل D با میکروسکوپ نوری معکوس نشان می‌دهد، شکل E درصد سلول‌های GFP مثبت را در گروه Lenti miR-579 نشان می‌دهد، شکل F درصد سلول‌های GFP مثبت را در گروه Lenti miR-control با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری نشان می‌دهد.



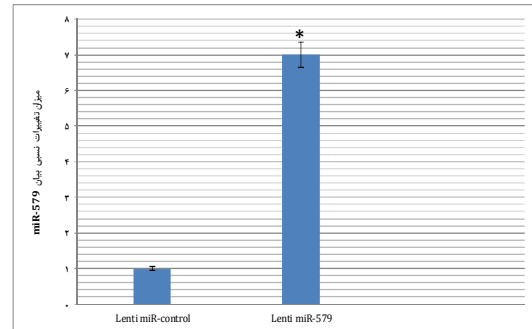
شکل ۳) نتایج ساخت سازه ویروسی؛ شکل A بررسی میزان ترانسفکت شدن سلول‌های HEK293T بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تولید ویروس را نشان می‌دهد، شکل B سلول‌های HEK293T آلوده شده با ویروس تغلیظ شده Lenti miR-579 با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت را نشان می‌دهد، شکل C درصد سلول‌های GFP مثبت آلوده شده با ویروس تغلیظ شده Lenti miR-579 با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری را نشان می‌دهد

بحث

گلیوبلاستوما یکی از انواع سرطان‌های مقاوم به درمان (پرتو-شیمی‌درمانی) است؛ بنابراین به درمان پاسخ نمی‌دهد و در نهایت سبب مرگ زود هنگام بیمار خواهد شد. تلاش‌های بسیاری به منظور یافتن مکانیزم‌های مولکولی ایجادکننده این بیماری و افزایش پاسخ تومور به درمان در حال انجام است [18]. از جمله مهم‌ترین مسیرهای مولکولی که در GBM فعالیت بالایی دارند می‌توان مسیر *EGFR* و *AKT* را نام برد. *miRNA*ها از جمله مواردی هستند که نه تنها می‌توانند سبب افزایش یا کاهش فعالیت این مسیر مولکولی شوند بلکه قادر هستند دیگر مسیرهای مولکولی را نیز دستخوش تغییر نمایند، به طور مثال *miRNA*هایی هستند که با تغییر بیان ژن‌های دخیل در مرگ برنامه‌ریزی شده مانند *Bcl2* و *BAX* قابلیت منحصر به فردی را برای فرار از مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی ایجاد می‌کنند. افزایش بیان ژن *Bcl2* و کاهش بیان ژن *BAX* مرتبط با مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. یک *miRNA* این توانایی را دارد که ژن‌های یک یا چند مسیر مولکولی مختلف را هدف قرار دهد، بنابراین قابلیت آن را دارند که به عنوان درمان مولکولی از آنها استفاده کرد [19, 20]. طی بررسی‌های بیوانفورماتیکی صورت گرفته مشخص شد که *miR-579* قادر است تعدادی از ژن‌هایی که در اثر وقوع جهش در ژن *PTEN* و مسیر *PI3K-AKT* افزایش بیان یا فعالیت پیدا می‌کنند را مهار کند، بنابراین این احتمال وجود دارد که بتواند با مهار رشد سلول، القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و توقف چرخه سلولی به عنوان ژن درمانی از آن برای درمان سرطان گلیوبلاستوما استفاده کرد. از طرف دیگر با توجه به اینکه تاکنون افزایش بیان *miR-579* در رده سلولی سرطان گلیوبلاستوما مورد بررسی و مطالعه قرار نگرفته بود این *miRNA* برای بررسی انتخاب شد.

در مطالعه حاضر سعی شد به مطالعه افزایش بیان *miR-579* یکی از رده‌های سلولی این سرطان بنام A-172 پرداخته شود. از ویژگی‌های ژنتیکی این رده سلولی می‌توان به جهش در ژن‌هایی مانند *p14ARF*, *p16(CDKN2A)* و عدم بیان پروتئین *PTEN* در این رده سلولی اشاره نمود. از سویی جهش در ژن *p53* در این رده سلولی وجود ندارد [21]. مراحل انجام پروژه به این صورت بود که ابتدا با استفاده از روش PCR قطعه ژنی حاوی پیش‌ساز *miR-579* تکثیر، سپس در پلاسمید pCDH همسانه‌سازی شد. یکی از ویژگی‌های این وکتور پلاسمیدی داشتن توالی کدکننده پروتئین GFP درخشانده است که به راحتی می‌توان تولید این پروتئین را با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده کرد. این وکتور پلاسمیدی به گونه‌ای طراحی شده است که با استفاده از آن می‌توان ویروس لنتی نوترکیب تولید نمود. از ویژگی‌های سیستم بیانی لنتی ویروسی توانایی آن در بیان پایدار و طولانی مدت ژن‌های خارجی در سلول‌های پستانداران است. این نوع وکتورهای ویروسی قادر هستند هم سلول‌های تکثیرشونده و هم می‌تواند سلول‌هایی که تکثیر ندارند (سلول‌های عصبی) را آلوده نمایند [22]. بر اساس همین ویژگی‌ها با بسته‌بندی ژنوم کدکننده *miR-579* در سازه لنتی ویروسی می‌توان به طور پایدار و طولانی مدت آن را در سلول‌های A-172 بیان نمود. ژنوم ویروس در ابتدا به صورت RNA تک‌رشته‌ای حاوی توالی کدکننده پروتئین GFP است که بعد از تبدیل شدن به cDNA در ژنوم سلول درج و بیان می‌شود. بنابراین چنانچه مرحله ساخت و بسته‌بندی ذرات ویروسی به درستی اتفاق افتاده باشد سلول‌های آلوده توسط میکروسکوپ فلورسنت سبز رنگ

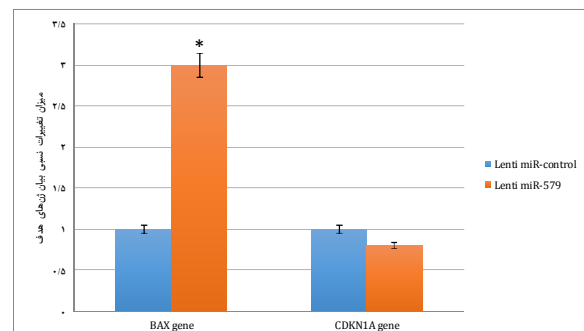
تغییرات سطح بیانی *miR-579* در سلول‌های Lenti *miR-579* و *control* و سلول‌های آزمون (ترانسداکت شده به وسیله ویروس حاوی *miR-579*) در مقایسه با ژن کنترل درون زاد (*snord47*) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطح بیان *miR-579* در سلول‌های آزمون افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت ($p < 0.001$). محاسبه نسبت بیان *miR-579* با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. نتایج حاصل از سه تکرار بیولوژیکی مستقل در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱) میزان نسبی بیان *miR-579* در سلول‌های مورد آزمایش با استفاده از روش PCR در زمان واقعی؛ نتایج نشان داد که میزان بیان *miR-579* در سلول‌های آزمون آلوده شده با ویروس Lenti *miR-579* افزایش هفت برابر در مقایسه با سلول‌های آلوده شده با Lenti *miR-control* یافت؛ هر ستون میانگین سه آزمایش مستقل است و علامت ستاره * معنی‌دار بودن تفاوت گروه آزمون با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

تغییر سطح بیان ژن‌های *BAX* و *CDKN1A* پس از ترانسداکت سلول‌های A-172

پس از اینکه ترانسداکت ویروس حاوی *miR-579* در سلول‌های A-172 به افزایش بیان *miR-579* تا هفت برابر در مقایسه با سلول‌های کنترل منجر شد، تغییرات بیانی ژن‌های *BAX* و *CDKN1A* در سلول‌های مورد نظر بررسی شدند. نتایج نشان داد که در سلول‌های آزمون سطح بیانی ژن‌های *BAX* در مقایسه با سلول‌های Lenti *miR-control* افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0.001$). به طوری که افزایش بیان سه‌برابری برای ژن *BAX* مشاهده شد. در مقابل کاهش بیان ژن *CDKN1A* گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل رخ داد که البته این کاهش بیان از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۲؛ $p = 0.72$).



نمودار ۲) میزان نسبی بیان ژن‌های *BAX* و *CDKN1A* در سلول‌های مورد آزمایش با استفاده از روش PCR در زمان واقعی؛ میزان بیان *BAX* در سلول‌های آزمون آلوده شده با ویروس لنتی نوترکیب افزایش سه‌برابری در مقایسه با سلول‌های آلوده با Lenti *miR-control* داشت. میزان بیان ژن *CDKN1A* در سلول‌های آزمون آلوده شده با ویروس لنتی *miR-579* در مقایسه با سلول‌های آلوده با Lenti *miR-control* کاهش بیان نشان داد ($p = 0.72$)؛ هر ستون میانگین سه آزمایش مستقل است و علامت ستاره * معنی‌دار بودن تفاوت گروه آزمون با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($p < 0.001$).

مقدمه/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪): مسعود سلیمانی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪): احسان عارفیان (نویسنده چهارم) پژوهشگر کمکی (۲۰٪): فاطمه کوه‌کن (نویسنده پنجم) پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: مقاله حاضر بخشی از پایان‌نامه دانشجوی مقطع دکتری تخصصی رشته ژنتیک دانشگاه علوم تحقیقات تهران هست که با حمایت مالی (گزارش شماره ۹۴۲۹۷۴) موسسه ملی توسعه تحقیقات پزشکی ایران انجام شده است.

منابع

- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007;170(5):1445-53.
- Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(6):479-89.
- Henriksen M, Johnsen KB, Andersen HH, Pilgaard L, Duroux M. MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme - a systematic overview. *Mol Neurobiol*. 2014;50(3):896-913.
- Wang Y, Wang X, Zhang J, Sun G, Luo H, Kang C, et al. MicroRNAs involved in the EGFR/PTEN/AKT pathway in gliomas. *J Neurooncol*. 2012;106(2):217-24.
- Kaddar T, Rouault JP, Chien WW, Chebel A, Gadoux M, Salles G, et al. Two new miR-16 targets: Caprin-1 and HMGA1, proteins implicated in cell proliferation. *Biol Cell*. 2009;101(9):511-24.
- Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: Discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):215-20.
- Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;334(4):1351-8.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65(14):6029-33.
- Møller HG, Rasmussen AP, Andersen HH, Johnsen KB, Henriksen M, Duroux M. A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: Micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):131-44.
- Mueller AK, Lindner K, Hummel R, Haier J, Watson DI, Hussey DJ. MicroRNAs and their impact on radiotherapy for cancer. *Radiat Res*. 2016;185(6):668-77.
- Fattore L, Mancini R, Acunzo M, Romano G, Laganà A, Pisanu ME, et al. miR-579-3p controls melanoma progression and resistance to target therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(34):E5005-13.
- Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2016;42:63-71.
- Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, Zhang Z, Lapolla SM, Plafker SM, et al. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem*. 2006;281(21):14764-75.
- Pawlowski J, Kraft AS. Bax-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):529-31.
- Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: Intricate networks

دیده می‌شوند. در مرحله بعد اقدام به تولید موفق آمیز ویروس لنتی حاوی پیش‌ساز miR-579 شد، به طوری که حجم کمی از ویروس توانسته بود ۲۹٪ سلول‌های HEK293T را آلوده و با بیان پروتئین GFP سبز رنگ نماید. نتایج میکروسکوپ فلورسنت و فلوسایتومتری نشان داد که ترانسداکت سلول‌های A-172 به خوبی صورت گرفته است و سبب بیش بیان این miRNA در سلول‌های آزمون تا هفت برابر گروه کنترل شده است. در مرحله بعد، تغییر بیان ژن‌های مورد نظر مشاهده شد که افزایش بیان miR-579 سبب افزایش بیان معنی‌دار ژن BAX در مقایسه با سلول‌های کنترل، شده است تا احتمال وقوع و پیشرفت فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و فعال شدن کاسپازها را القا کند. اما نتوانست تغییر معنی‌داری در بیان ژن CDKN1A ایجاد کند.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ صورت گرفت محققین برای اولین بار موفق به کشف خاصیت سرکوب‌کننده نوموری برای miR-579 در سرطان ملانوما شدند. آنها ابتدا با استفاده از فناوری میکروآرایه به مطالعه تغییر بیان miR-579 در بافت نوموری و رده‌های سلولی سرطانی در مقایسه با بافت و سلول‌های نرمال پرداختند. نتایج آنها حاکی از کاهش بیان این miRNA در بافت سرطانی بود. آنها همچنین توانستند به صورت مصنوعی میزان بیان miR-579 در رده‌های سلولی سرطان ملانوما افزایش دهند. سپس با استفاده از روش وسترن بلات متوجه شدند که افزایش بیان این miRNA سبب مهار بیان پروتئین MDM2 و افزایش میزان بیان پروتئین p21 و p53 در سلول‌های تیمار شده، به همراه توقف چرخه سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌شود [23]. در تحقیق حاضر با توجه به اینکه تغییرات بیان ژن CDKN1A صرفاً با استفاده از روش PCR در زمان واقعی ارزیابی شد اما شواهدی مبنی بر اینکه افزایش بیان miR-579 می‌تواند سبب افزایش میزان بیان mRNA این ژن در رده سلولی A-172 گلیوبلاستوما شود مشاهده نشد، که احتمال می‌رود این تفاوت رفتار miR-579 در رده سلولی گلیوبلاستوما در مقایسه با رده‌های سلولی ملانوما ناشی از وجود گوناگونی و تنوع ژنتیکی بین این دو نوع رده سلولی باشد. در مقابل miR-579 توانسته بود بیان BAX را تا سه برابر افزایش دهد.

در پایان می‌توان امیدوار بود که با استفاده از روش‌هایی مانند وکتورهای لنتی ویروسی که بیان پایداری از ژن‌های حامل خود را برای ما فراهم می‌کنند. miRNAهایی را به سلول‌های سرطانی انتقال داد که بتوانند به طور هم‌زمان سبب توقف رشد، مهار چرخه سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شوند، تا شاید در آینده نزدیک تاثیر شایانی در درمان کمکی سرطان داشته باشند.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان miR-579 در رده سلولی A-172 می‌تواند بیان ژن BAX را افزایش دهد؛ اما در بیان ژن CDKN1A تغییر معنی‌داری ایجاد نمی‌کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از حمایت‌های مالی و معنوی مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته و کارکنان محترم آن مرکز کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تابیدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: محمدرضا کلهری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۰٪)؛ شیوا ایرانی (نویسنده دوم)، نگارنده

- Dusmatova S, et al. MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. *Cancer Med.* 2016;5(8):1917-46.
- 20- Haffty BG, Glazer PM. Molecular markers in clinical radiation oncology. *Oncogene* 2003;22(37):5915-25.
- 21- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.* 1999;9(3):469-79.
- 22- Scherr M, Battmer K, Ganser A, Eder M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle.* 2003;2(3):251-7.
- 23- Zhang HH, Pang M, Dong W, Xin JX, Li YJ, Zhang ZC, et al. miR-511 induces the apoptosis of radioresistant lung adenocarcinoma cells by triggering BAX. *Oncol Rep.* 2014;31(3):1473-9.
- and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-14.
- 16- Wu T, Li Y, Liu B, Zhang S, Wu L, Zhu X, et al. Expression of Ferritin light chain (FTL) is elevated in Glioblastoma, and FTL silencing inhibits glioblastoma cell proliferation via the GADD45/JNK pathway. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149361.
- 17- Yu XF, Zou J, Bao ZJ, Dong J. miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol.* 2011;17(42):4711-7.
- 18- Skalsky RL, Cullen BR. Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One.* 2011;6(9):e24248.
- 19- Shea A, Harish V, Afzal Z, Chijioke J, Kedir H,