



Expression Level of miR-9 in Exosomes Derived from Ovarian Epithelial Carcinoma Cells and the Effects of Exosome Treatment on VEGF Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Keshtdar F.¹ MSc,
Ramezani R.* PhD

How to cite this article

Keshtdar F, Ramezani R. Expression Level of miR-9 in Exosomes Derived from Ovarian Epithelial Carcinoma Cells and the Effects of Exosome Treatment on VEGF Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Pathobiology Research. 2018;21(1):35-40.

*Department of Biomedical Sciences, Women Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran

¹Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Department of Biomedical Sciences, Women Research Center, Alzahra University, Deh Vanak Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1993893973

Phone: +98 (21) 85692095

Fax: +98 (21) 88049809

re.ramezani@alzahra.ac.ir

Article History

Received: October 6, 2017

Accepted: November 18, 2017

ePublished: April 10, 2018

ABSTRACT

Aims Exosomes are considered as a protective and enriched source of shuttle microRNAs. However, the precise biological mechanism of exosomal microRNAs in recipient cells remains to be further clarified. The aim of this study was to investigate Expression level of miR-9 in exosomes derived from ovarian epithelial carcinoma cells and the effects of exosome treatment on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression in human umbilical vein endothelial cells. **Materials & Methods** Exosomes were purified from the conditioned medium of ovarian epithelial carcinoma cells. Exosome size and morphology were examined by a scanning electron microscope. Purified exosomes were labeled with PKH26 red fluorescent labeling kit, then labeled exosomes were incubated with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for 12h at 37°C, and the cellular uptake was monitored using an inverted fluorescence microscope. Expression levels of miR-9 and VEGF were measured by real-time PCR. Paired t-test was used for data analysis.

Findings The purified MSCs-derived exosomes had a spherical shape with a diameter between 50 to 100nm. PKH26-labeled exosomes can be taken up by SKOV3 tumor cells with high efficiency. The expression levels of miR-9 in both ovarian tumor cells and their exosomes. Exosomes derived from ovarian tumor cells caused increased expression of VEGF in exosome-treated endothelial cells.

Conclusion Exosomes derived from ovarian tumor cells led to increased expression of VEGF in endothelial cells. As miR-9 was enriched in both ovarian tumor cells and their exosomes, it seems that exosomal transfer of miR-9 may affect the expression of VEGF in endothelial cells during tumor angiogenesis.

Keywords Ovarian Neoplasms; Exosomes; Angiogenesis Inducing Agents; Vascular Endothelial Growth Factor

CITATION LINKS

[1] Ovarian cancer pathogenesis: A model ... [2] Molecular characterization of epithelial ovarian cancer ... [3] Angiogenesis [4] The role of angiogenesis in solid tumours ... [5] ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins ... [6] Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic ... [7] MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes ... [8] Membrane vesicles as conveyors of immune ... [9] Exosomes: Current knowledge of their composition, biological ... [10] The roles of tumor-derived exosomes in cancer ... [11] Therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived exosomes ... [12] Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel potential ... [13] MicroRNAs: Key regulators of ... [14] MicroRNA-Mediated post-transcriptional regulation of ... [15] Cell-free microRNAs as cancer biomarkers: The odyssey of miRNAs through ... [16] The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer ... [17] Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the ... [18] miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and ... [19] Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 ... [20] MicroRNA-9 promotes tumor metastasis via repressing E-cadherin in esophageal squamous ... [21] Validation and comparison of two quantitative real-time PCR assays for direct detection of ... [22] Therapeutics targeting angiogenesis: Genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling ... [23] MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast ... [24] Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells ... [25] The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior ... [26] STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes ...

سطح بیانی miR-9 در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های اپیتلیال کارسینومای تخمدان و تاثیر تیمار اگزوزومی بر بیان ژن VEGF در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی

فرشته کشتدار MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ریحانه رضانی* PhD

گروه بیومدیکال، پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهراء(ع)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری منبعی غنی از میکروRNAها هستند ولی عملکرد زیستی آنها در سلول‌های پذیرنده به‌خوبی مشخص نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی سطح بیانی miR-9 در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های اپیتلیال کارسینومای تخمدان و تاثیر تیمار اگزوزومی بر بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های اپیتلیال کارسینومای تخمدان جداسازی شده، اندازه و شکل ظاهری آنها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی شد. اگزوزوم‌های تخلیص شده با رنگ فلورسنت PKH نشان‌دار، سپس سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی با اگزوزوم‌های نشان‌دار شده تیمار و جذب سلولی توسط میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. به‌وسیله PCR کمی، بررسی سطوح بیانی miR-9 و ژن VEGF صورت گرفت و آزمون T جفتی برای تحلیل داده‌ها به‌کار رفت.

یافته‌ها: اگزوزوم‌ها به‌شکل وزیکول‌هایی کروی شکل با قطری بین ۱۰۰-۱۵۰ نانومتر مشاهده شدند. اگزوزوم‌های نشان‌دار در سیتوپلاسم سلول‌های اندوتلیال مکان‌یابی شدند. این امر حاکی از قابلیت جذب اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری توسط سلول‌های اندوتلیال بود. هم در سلول‌های توموری تخمدان و هم در اگزوزوم‌های مشتق از آنها، miR-9 بیان شد. سطح بیانی miR-9 در اگزوزوم‌ها بیشتر و اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان منجر به افزایش معنی‌دار بیان سطح رونوشت ژن VEGF در سلول‌های اندوتلیال شدند.

نتیجه‌گیری: اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان موجب افزایش سطح بیان رونوشت ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در سلول‌های اندوتلیال می‌شوند و احتمالاً انتقال اگزوزومی miR-9 می‌تواند مکانیزمی برای چگونگی افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در روند رگ‌زایی تومور در سلول‌های اندوتلیال باشد.

کلیدواژه‌ها: سرطان تخمدان، اگزوزوم، عوامل القاکننده رگ‌زایی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۷

*نویسنده مسئول: re.ramezani@alzahra.ac.ir

مقدمه

سرطان تخمدان به‌عنوان چالش بزرگ بالینی در زمینه بیماری‌های زنان و زایمان محسوب می‌شود. علت این امر عدم وجود علائم مشخص بیماری تا زمان عود و پیشرفت تومور است که سبب شده موارد بسیاری از آن تا زمان وقوع متاستاز تشخیص داده نشود [1]. در حدود ۹۰٪ تومورهای تخمدان از نوع سرطان اپیتلیال هستند که اغلب با آغاز دوران یائسگی دیده می‌شوند. تشخیص زودهنگام تومورهایی کوچک و محدود به تخمدان از عوامل مهم پیش‌آگهی است [2].

رگ‌زایی به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق اولیه بوده که در حالات مختلف آسیب‌شناختی از قبیل رشد تومور، متاستاز، آرتریتروماتوز و همچنین در فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد

و نمو اندام، ترمیم زخم و تولید مثل دخالت دارد. رشد تومورهای جامد به‌طور کامل به ایجاد رگ‌های جدید و رفع نیازهای تغذیه‌ای تومور بستگی دارد. فاکتورهای رگ‌زایی به‌وسیله سلول‌های توموری در محیط رها و موجب تحریک انواع مختلف سلول‌های طبیعی مانند سلول‌های اندوتلیال مویرگ‌های مجاور تومور می‌شوند. این سلول‌ها غشای پایه خود (تکیه‌گاه سلول‌های اندوتلیال) را تجزیه کرده و با جداسازی سلول‌های همسایه و ورود به ماتریکس خارج سلولی، به سمت توده تومورها مهاجرت می‌کنند. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) برای سلول‌های اندوتلیال عروقی مشتق شده از سرخرگ‌ها، سیاهرگ‌ها و عروق لنفاوی به‌عنوان میتوز عمل کرده و موجب افزایش رگ‌زایی می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که VEGF باعث نفوذپذیری عروق می‌شود، به‌طوری که افزایش در نفوذپذیری عروق، یک مرحله مهم و اساسی در رگ‌زایی تومورها و زخم‌ها است [3, 4].

اگزوزوم‌ها دسته ویژه‌ای از وزیکول‌های کوچک ترشحی با منشا اندوزومی هستند که توسط بسیاری از انواع سلولی از جمله سلول‌های توموری ترشح می‌شوند. اگزوزوم‌ها ویژگی‌های ساختاری و ریخت‌شناختی دارند و می‌توان آنها را ذراتی کروی شکل با دو لایه لیپیدی نامید که اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر دارند [5-7]. اگزوزوم‌ها نقش‌های متعددی دارند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به برقراری ارتباطات سلول-سلول در فواصل نزدیک (میکرومحیط سلول‌ها) و فواصل دور در بدن اشاره کرد. در دهه گذشته علاقه‌مندی‌های زیادی در زمینه مطالعه عملکرد اگزوزوم‌ها ایجاد شده و مطالعات زیادی اشاره به این نکته دارند که اگزوزوم‌ها به‌عنوان ابزارهای مهم ارتباطات سلول-سلول در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک و آسیب‌شناختی حفاظت شده از نظر تکاملی، عمل می‌نمایند. وقایعی مانند دفع پروتئین‌های زاید، عرضه آنتی‌ژن، پاسخ ایمنی، رگ‌زایی، التهاب، متاستاز، گسترش عوامل بیماری‌زا و بسیاری از فعالیت‌های دیگر از جمله نقش‌های این وزیکول‌ها بسته به محتوای آنها در بدن هستند [8-12].

سلول‌های توموری مقادیر قابل توجهی اگزوزوم ترشح می‌کنند. این اگزوزوم‌ها حاوی mRNAهای مختلفی با ویژگی‌های عملکردی و همچنین الگوی ویژه‌ای از میکروRNAهای بالغ هستند. مولکول‌های میکروRNA (miRNAs یا miRs) رده‌ای از RNAهای کوچک و غیرکدکننده درون‌زاد هستند که بیان ژن را در سطح پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن تنظیم می‌کنند [13-15]. مولکول‌های میکروRNA می‌توانند از طریق اگزوزوم‌ها به سلول‌های پذیرنده وارد شوند و از این راه تغییرات عملکردی و فنوتیپی را در آن سلول‌ها القا کنند. ممکن است سلول‌های توموری اثرات زیستی‌شان را با انتقال اطلاعات ژنتیک و تغییر در بیان ژن‌های سلول هدف به‌واسطه انتقال اگزوزومی mRNA و میکروRNAها انجام دهند [16].

اخیراً نقش جدیدی از miR-9 در تنظیم رگ‌زایی توموری در سلول‌های اندوتلیال گزارش شده است [17]. گزارشاتی وجود دارد که سطح بیانی miR-9 در بسیاری از انواع سرطان افزایش می‌یابد و این افزایش بیان همراه با افزایش سطح بیانی ژن VEGF است [18, 19]. همچنین miR-9 از طریق سرکوب بیان E-کاده‌رین موجب تشدید تحرک سلولی و متاستاز می‌شود [20].

مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح بیانی miR-9 در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های اپیتلیال کارسینومای تخمدان و تاثیر تیمار اگزوزومی بر بیان ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی (HUVEC) انجام شد.

مواد و روش‌ها

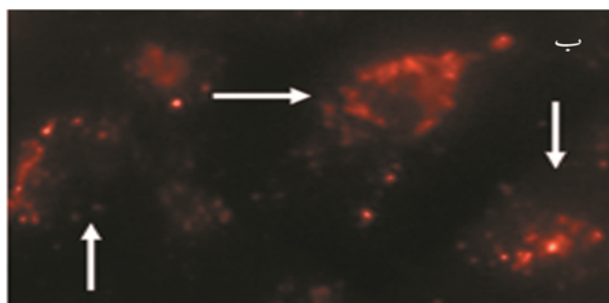
در این مطالعه تجربی، رده سلولی SKOV-3 (انستیتو پاستور؛ ایران) در محیط کشت DMEM (محیط کشت عقاب اصلاح شده دالیکو) حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گوساله (FBS) عاری از آگروزوم، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین G و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، در انکوباتور مرطوب با ۵٪ دی‌اکسیدکربن و دمای ۳۷°C کشت داده شد. برای جداسازی آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری، ابتدا محیط سلول‌های کشت داده شده به منظور حذف هر گونه سلول باقی‌مانده و بقایای سلولی در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی جمع‌آوری و به آن، حجم مناسبی از محلول رسوب‌گذاری کیت جداسازی ExoQuick-TC (SBI؛ ایالات متحده)، مطابق دستورالعمل سازنده افزوده و به خوبی مخلوط شد. انکوباسیون ۱۲ ساعته محلول در دمای ۴°C و سپس سانتریفوژ آن در شرایط ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C صورت پذیرفت. رسوب حاصل آگروزوم بود و در بافر فسفات‌سالین (PBS) حل شد. غلظت آگروزوم‌های جداسازی شده با آزمون برادفورد تعیین و آگروزوم جداسازی شده در دمای ۲۰°C - نگهداری شد.

ارزیابی شکل ظاهری آگروزوم‌ها: در میکروسکوپ الکترونی به جای نور از شعاع الکترونی استفاده می‌شود. از آنجا که طول موج الکترون بسیار کوتاه است، در میکروسکوپ الکترونی تصاویر با بزرگ‌نمایی بسیار بالا به دست می‌آید. در این مطالعه برای مشاهده میکروسکوپی، حجم اندکی از آگروزوم تخلیص شده، با گلو تار آلذئید ۲/۵٪ تثبیت و با بافر فسفات‌سالین شسته شد. سپس نمونه با اتانول آب‌گیری و روی سطح شیشه‌ای خشک و با لایه نازکی از طلا پوشانده شد. ارزیابی اندازه و وضعیت ظاهری آگروزوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل KYKY-EM3200 (Aparna Technoimpex؛ چین) صورت گرفت.

نشان‌دار نمودن آگروزوم‌ها و ارزیابی قابلیت جذب سلولی آنها: روند نشان‌دار شدن به واسطه واکنش رنگ چربی‌دوست با غشای آگروزومی انجام می‌شود. شدت نشان‌دار شدن به دو عامل غلظت رنگ و غلظت آگروزوم بستگی دارد. نشان‌دار شدن بیش از حد موجب از بین رفتن یکپارچگی غشا و کاهش ارزیابی آگروزوم‌ها می‌شود. برای نشان‌دار شدن آگروزوم‌ها از کیت نشان‌گذاری رنگ فلورسنت قرمز PKH26 (سیگما؛ ایالات متحده) مطابق دستورالعمل سازنده و با انجام تغییرات جزئی استفاده شد. به طور خلاصه، میزان یک میلی‌لیتر از Diluent C موجود در کیت، به رسوب آگروزومی افزوده و محلول رنگ آمیزی شامل ۴ میکرولیتر از رنگ PKH که توسط Diluent C به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شده است به سوسپانسیون آگروزومی اضافه و به مدت ۵ دقیقه در

دمای اتاق انکوبه شد. به منظور توقف واکنش نشان‌دار شدن، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کامل به سوسپانسیون افزوده شد. برای رسوب‌گذاری آگروزوم‌های نشان‌دار شده نیز مشابه شرح ذکر شده در بخش جداسازی آگروزوم، از کیت جداسازی ExoQuick-TC (SBI؛ ایالات متحده)، استفاده و رسوب آگروزومی نشان‌دار شده در PBS حل شد. در انتها، سلول‌های HUVEC توسط آگروزوم‌های نشان‌دار شده به مدت ۱۲ ساعت تیمار شدند. پس از جایگزینی محیط رویی سلول‌ها و شست‌وشو با PBS، جذب سلولی آگروزوم‌های نشان‌دار به وسیله میکروسکوپ فلورسنت مدل CKX41 (المپیوس؛ ژاپن) ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زمان واقعی یا PCR کمی (Real-time PCR یا qPCR): به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه، RNA تام از سلول یا آگروزوم به وسیله واکنشگر تراپیزول (Invitrogen؛ ایالات متحده) استخراج و به منظور حذف آلودگی احتمالی با DNA ژنومی، با آنزیم DNase تیمار شد. کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز تایید شد، سپس خلوص و غلظت آن به وسیله اسپکتروفتومتری با جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. برای سنتز cDNA، ۳ میکروگرم از RNA تام استخراج شده با آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Takara؛ ژاپن) نسخه‌برداری معکوس شد. برای انجام واکنش qPCR، مخلوط واکنشی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین I (Takara؛ ژاپن)، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۷ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم cDNA سنتز شده، تهیه شد. واکنش qPCR در دستگاه ترمال سایکلر مدل ABI (Applied Biosystems؛ ایالات متحده) تحت شرایط دمایی و زمانی مشخص انجام شد. ابتدا ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله واسرشتگی اولیه انجام شد و سپس برنامه دمایی به صورت مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۲°C به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله توسعه در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه در ۴۰ چرخه تکرار شد. به منظور ترسیم منحنی ذوب نیز از برنامه زمانی و دمایی شامل ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰°C برای یک دقیقه و ۹۵°C برای ۳۰ ثانیه استفاده شد. مقادیر رونوشت ژن *VEGF* در مقایسه با بیان ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه‌دار و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد [21]. برای ارزیابی بیان miR-9، RNA آگروزومی استخراج شده، ابتدا به وسیله کیت (پارس ژن‌گان فن‌آور؛ ایران) پلی‌آدنیله و سپس سنتز cDNA مطابق دستورالعمل انجام شد. به هنجارسازی تغییرات سطح بیانی miRNA در مقایسه با سطح بیانی ژن کنترل داخلی RNA کوچک هسته‌ای U6 (U6 snRNA) صورت گرفت. از آزمون T جفتی برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.



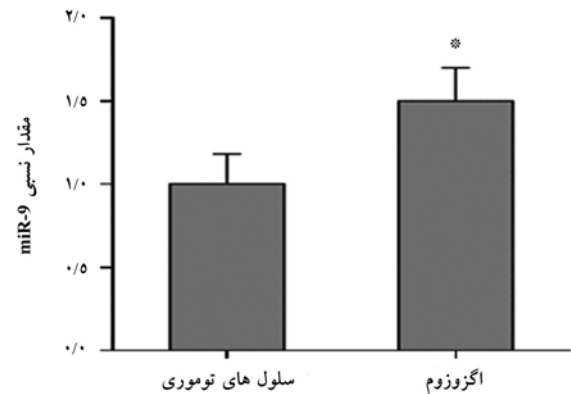
شکل ۱ تایید هویت و ارزیابی قابلیت جذب سلولی آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان؛ (الف) میکروگراف الکترونی نگاره از آگروزوم‌های جداسازی شده، ذرات کروی محصور شده با غشا با دامنه اندازه ۶۰ الی ۱۰۰ نانومتر را نشان داد. (ب) بررسی قابلیت جذب آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری توسط سلول‌های اندوتلیال؛ نور فلورسنت قرمز نشان داد که آگروزوم‌های سلول توموری تخمدان به داخل سلول HUVEC وارد شدند.

یافته‌ها

اگزوزوم‌ها به شکل وزیکول‌هایی کروی شکل با دامنه اندازه بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر مشاهده شدند (شکل ۱).

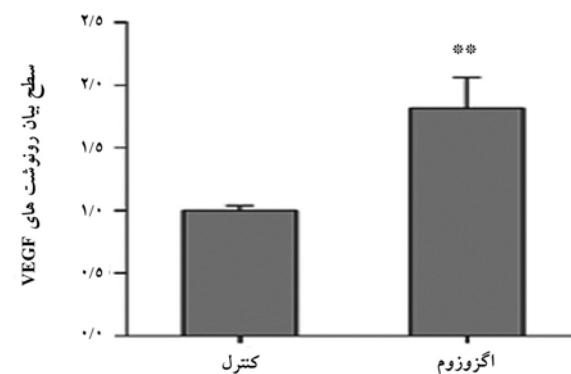
اگزوزوم‌های نشان‌دار شده با رنگ فلورسانت PKH26 در سیتوپلاسم سلول‌های اندوتلیال مکان‌یابی شدند (شکل ۱). این امر حاکی از قابلیت جذب اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری توسط سلول‌های اندوتلیال بود.

هم در سلول‌های توموری تخمدان و هم در اگزوزوم‌های مشتق از آنها، miR-9 بیان شد (نمودار ۱). البته سطح بیانی این miRNA در اگزوزوم‌ها بیشتر بود.



نمودار ۱) سطح بیانی miR-9 در سلول‌های توموری تخمدان و اگزوزوم‌های مشتق از آنها؛ سطح بیانی miR-9 در مقایسه با سطح بیانی U6snRNA به‌همچرا شد ($P < 0.05$).

اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان به افزایش معنی‌دار بیان سطح رونوشت ژن *VEGF* در سلول‌های اندوتلیال منجر شدند (نمودار ۲).



نمودار ۲) بررسی کفی سطح بیان رونوشت‌های *VEGF* در سلول‌های اندوتلیال HUVEC تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اگزوزوم و کنترل پس از ۲۴ ساعت؛ سطح رونوشت‌های ژن *VEGF* توسط PCR کفی اندازه‌گیری و با بیان ژن *GAPDH* به‌همچرا شد. تیمار اگزوزومی به افزایش سطح بیان رونوشت ژن *VEGF* در سلول‌های اندوتلیال منجر شد ($P < 0.01$).

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح بیانی miR-9 در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های اپیتلیال کارسینوما تخمدان و تاثیر تیمار اگزوزومی بر بیان ژن *VEGF* در سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسانی انجام شد.

سلول‌های توموری از طریق ترشحات خود با سایر سلول‌های موجود در میکرومحیط خود در ارتباط هستند. اگزوزوم‌ها وزیکول‌های

کوچک مشتق از اجسام چندوزیکولی هستند که توسط بسیاری از سلول‌ها به محیط خارج از سلول ترشح شده و از این طریق در ارتباطات بین سلولی از طریق انتقال اطلاعات ژنتیک نظیر RNAهای کدکننده و غیرکدکننده به سلول‌های هدف مشارکت دارند. اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری منبعی غنی از میکروRNAها هستند که می‌توانند در پی ترشح از سلول‌های توموری میکرو محیط خود از جمله روند رگ‌زایی را دستخوش تغییر نمایند. با این حال عملکرد زیستی میکروRNAهای اگزوزومی در سلول‌های پذیرنده به‌خوبی مشخص نشده است [22].

شواهد نشان می‌دهند که miRNAها تنظیم‌کننده‌های کلیدی عملکرد سلول اندوتلیال بوده و به‌طور ویژه رگ‌زایی را تنظیم می‌کنند [23]. در این راستا، گزارش شده است که miR-424 رگ‌زایی برون‌تن و درون‌تن در مدل موشی را از طریق هدف‌گیری بیان ژن *Cullin 2* تشدید می‌کند [24]. خانواده miR-30 نیز از طریق هدف‌گیری رونوشت ژن *DL4* موجب تشدید رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال می‌شود [25]. لیو و همکاران گزارش کردند اگزوزوم‌های حامل miR-21 در سرم خون افراد مبتلا به سرطان ریه با الحاق به سلول‌های اندوتلیال و هدف قراردادن *STAT3* در مسیر پیام‌رسانی JAK-STAT قادر به افزایش بیان فاکتور *VEGF* هستند و این امر به افزایش رگ‌زایی منتج می‌شود [26].

از آنجا که بر پایه مطالعات گذشته miR-9 یکی از miRNAهای موثر در روند رگ‌زایی و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال است [17]، در این مطالعه سطح بیان این miRNA در سلول‌های توموری تخمدان و اگزوزوم‌های مشتق از آن بررسی شد. طبق یافته‌های مطالعه حاضر، miR-9 هم در سلول‌های توموری تخمدان و هم در اگزوزوم‌های مشتق از آنها بیان شد. البته سطح بیانی این miRNA در اگزوزوم‌ها بیشتر بود و این بدین دلیل است که miRNAها در اگزوزوم‌ها غنی می‌شوند و از هضم نوکلئازی در امان می‌مانند بنابراین سطح بیانی miR-9 در اگزوزوم‌های توموری بیشتر از سلول‌های دهنده، مشاهده شد. همچنین اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان قابلیت ورود به سلول‌های اندوتلیال و جای‌گیری در سیتوپلاسم را داشتند. نتایج qPCR نشان داد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان منجر به افزایش معنی‌دار بیان سطح رونوشت ژن *VEGF* در سلول‌های اندوتلیال شد. در مجموع این مطالعه مشخص کرد که افزایش رگ‌زایی تومور که در سرطان تخمدان دیده می‌شود می‌تواند به‌علت انتقال اگزوزومی miR-9 از سلول‌های توموری تخمدان به سلول‌های اندوتلیال و تاثیر آن بر فاکتور *VEGF* باشد.

از آنجا که برای دستیابی به درمان، تعدیل موفقیت‌آمیز روند رگ‌زایی در سرطان ضروری است، ارزیابی اثرات استراتژی‌های درمانی باید علاوه بر رشد تومور، به جوانه‌زنی و انشعاب سلول اندوتلیال نیز معطوف باشد. با توجه به اینکه فاکتور رشد رگ‌زایی برای تداوم رگ‌زایی کافی است، مشخص کردن اجزای درون‌سلولی و برون‌سلولی که نو عروق‌زایی سلول توموری را طی رشد تومور تشدید می‌کند، ضروری است. در این راستا اگرچه سلول اندوتلیال در تشکیل میکرومحیط تومور مهم است، اثر ترشحات توموری روی رفتار سلول‌های اندوتلیال به‌ویژه در زمینه رگ‌زایی به تحقیقات بیشتری نیاز دارد. در این راستا از آنجا که اگزوزوم‌ها به‌عنوان منبع غنی و حفاظت‌شده میکروRNAها به‌شمار می‌آیند، به‌نظر می‌رسد انتقال اگزوزومی میکروRNAها از سلول‌های توموری ممکن است نقشی مهم در تنظیم رفتار سلول‌های اندوتلیال به‌ویژه در زمینه

horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20(5):847-56.

7- Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13-21.

8- Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-93.

9- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):940-8.

10- Yang C, Robbins PD. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:842849.

11- Motavaf M, Pakravan K, Babashah S, Malekvandfard F, Masoumi M, Sadeghizadeh M. Therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived exosomes: A promising cell-free therapeutic strategy in regenerative medicine. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016;62(7):74-9.

12- Safari S, Malekvandfard F, Babashah S, Alizadeh-Asl A, Sadeghizadeh M, Motavaf M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: A novel potential therapeutic avenue for cardiac regeneration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016;62(7):66-73.

13- Babashah S. *MicroRNAs: Key regulators of oncogenesis*. Switzerland: Springer International Publishing; 2014.

14- Behbahani GD, Ghahhari NM, Javidi MA, Molan AF, Feizi N, Babashah S. MicroRNA-Mediated post-transcriptional regulation of epithelial to mesenchymal transition in cancer. *Pathol Oncol Res*. 2017;23(1):1-12.

15- Javidi MA, Ahmadi AH, Bakhshinejad B, Nouraei N, Babashah S, Sadeghizadeh M. Cell-free microRNAs as cancer biomarkers: The odyssey of miRNAs through body fluids. *Med Oncol*. 2014;31(12):295.

16- Bach DH, Hong JY, Park HJ, Lee SK. The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer cells. *Int J Cancer*. 2017;141(2):220-30.

17- Zhuang G, Wu X, Jiang Z, Kasman I, Yao J, Guan Y, et al. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J*. 2012;31(17):3513-23.

18- Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010;12(3):247-56.

19- Shigehara K, Yokomuro S, Ishibashi O, Mizuguchi Y, Arima Y, Kawahigashi Y, et al. Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *PLoS One*. 2011;6(8):e23584.

20- Song Y, Li J, Zhu Y, Dai Y, Zeng T, Liu L, et al. MicroRNA-9 promotes tumor metastasis via repressing E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(22):11669-80.

21- Hayat Nosaeid M, Mahdian R, Jamali S, Maryami F, Babashah S, Maryami F, et al. Validation and comparison of two quantitative real-time PCR assays for direct detection of DMD/BMD carriers. *Clin Biochem*. 2009;42(12):1291-9.

22- Katoh M. Therapeutics targeting angiogenesis: Genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review). *Int J Mol Med*. 2013;32(4):763-7.

رگ‌زایی داشته باشد. با این حال از آنجا که محتوای مولکولی آگروزوم‌ها الزاماً در شرایط مختلف رشد سلولی ممکن است یکسان نباشد، چالش‌هایی در زمینه کاربرد بالینی آنها و پروفایل بیانی میکروRNAهای موجود، وجود دارد. با توجه به این چالش در مطالعه حاضر آگروزوم‌های حاصل شده از پاساژهای مختلف سلولی با یکدیگر آمیخته شد و اثرات مورد بررسی، برآیندی از تاثیر آگروزوم‌های سلول‌های توموری در چندین پاساژ متوالی بود. در مجموع به نظر می‌رسد، واکاوی دقیق مکانیزم زیستی میکروRNAهای آگروزومی در سلول‌های پذیرنده به تحقیقات بیشتر نیاز داشته باشد. شناسایی بیشتر ارتباطات درون‌سلولی میکروRNAها و مسیرهای پیام‌رسانی پایین‌دست می‌تواند در شناسایی مکانیزم‌های نوین در زمینه رگ‌زایی و توسعه راهکارهای درمانی جدید کمک کند.

نتیجه‌گیری

آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های توموری تخمدان، موجب افزایش سطح بیان رونوشت ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در سلول‌های اندوتلیال می‌شوند و احتمالاً انتقال آگروزومی miR-9 می‌تواند مکانیزمی برای چگونگی افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در روند رگ‌زایی تومور در سلول‌های اندوتلیال باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاری‌های صورت گرفته در دانشگاه الزهراء^(ع) و دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

تأییدیه اخلاقی: سلول SKOV-3 و HUVEC که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، از انستیتو پاستور- ایران تهیه شده و براساس آیین‌نامه زیستی این مرکز، تمامی مسائل اخلاقی در این خصوص رعایت شده است.

تعارض منافع: تعارض منافع وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فرشته کشتدار (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰٪)؛ ریحانه رضانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪).
منابع مالی: مطالعه حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک است.

منابع

1- Karst AM, Drapkin R. Ovarian cancer pathogenesis: A model in evolution. *J Oncol*. 2010;2010:932371.

2- Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez-Rodriguez L. Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: Implications for diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2113.

3- Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*. 2006;57:1-18.

4- Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. *Eur J Intern Med*. 2009;20(7):663-71.

5- Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. *ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids*. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D1241-4.

6- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for

2010;120(11):4141-54.

25- Bridge G, Monteiro R, Henderson S, Emuss V, Lagos D, Georgopoulou D, et al. The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis. *Blood*. 2012;120(25):5063-72.

26- Liu Y, Luo F, Wang B, Li H, Xu Y, Liu X, et al. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett*. 2016;370(1):125-35.

23- Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammadi M, Ataei F, et al. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017;40(5):457-70.

24- Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, Zhang X, Joshi HP, Basi D, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest*.