

Comparison of snRNA-U6 and microRNA-16 for Identification of Suitable Endogenous Control Gene for microRNA Gene Expression Analysis under Dendrosomal Curcumin Treatment in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines

Mina Zamani¹, Majid Sadeghizadeh^{2*}, Mehrdad Behmanesh³

1- M.Sc., Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 25/Jun/2014, Accepted: 27/Dec/2014

Abstract

Objective: MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded small RNAs 18-25 nucleotides in length that regulate gene expression through translational inhibition and mRNA cleavage. Aberrant expression of miRNAs contribute to several diseases. This has increased interest in profiling the expressions of these molecules. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) is a sensitive, quantitative technique for gene expression assessment. To correct for systematic variables such as the amount of starting template, RNA quality and enzymatic efficiencies, RQ-PCR data is commonly normalized to an endogenous control gene which is stably-expressed across the test sample set. To avoid occurring further error in the quantification of gene expression data, it is necessary that candidate endogenous controls be validated in the samples of interest. In this study the expression of miRNA-16 and small nuclear RNA (snRNA)-U6 in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines under dendrosomal curcumin treatment were evaluated to identify appropriate endogenous controls for dendrosomal curcumin-related miRNA expression assays.

Methods: HCC cell lines were treated with dendrosomal curcumin. Dendrosomal curcumin entry into HepG2 and HuH-7 cells was assessed by fluorescent microscopy images. RNA was extracted and cDNA, after polyA polymerization, was synthesised. Then, we performed gene expression assays using RQ-PCR.

Results: In this treatment condition, miRNA-16 for HepG2, snRNA-U6 and the combined miRNA-16 and snRNA-U6 for HuH-7 were suitable endogenous controls.

Conclusion: These genes are appropriate endogenous controls for miRNA expression assays in HCC cell lines under treatment with dendrosomal curcumin. There are stable, non-significant expression changes of these genes.

Keywords: microRNA, RQ-PCR, Endogenous control genes, Dendrosomal curcumin, Hepatocellular carcinoma

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 1, Pages: 67-82

مقایسه snRNA-U6 و microRNA-16 برای تعیین ژن کنترل درون زاد مناسب برای بررسی بیان ژن های microRNA تحت تیمار کورکومین دندروزومی در رده های سلولی سرطان کبد

مینا زمانی^۱، مجید صادقی زاده^{۲*}، مهرداد بهمنش^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۰۶

دریافت مقاله: ۹۳/۰۴/۰۴

چکیده

هدف: microRNA ها RNA های کوچک تک رشته ای با طول ۱۸-۲۵ نوکلئوتید است که با مهار ترجمه و برش mRNA در تنظیم بیان ژن شرکت دارد. بیان ناهنجار microRNA ها از عوامل رخداد بیماری های مختلف است که این مسئله علاقه به بررسی نمایه بیان آن ها را افزوده است. RQ-PCR تکنیکی کمی و حساس در بررسی بیان ژن هاست. برای تصحیح تغییرات سیستماتیک از جمله میزان الگوی آغازین، کیفیت RNA، کارایی آنزیم ها داده های RQ-PCR نسبت به یک ژن کنترل درون زاد که در مجموعه نمونه های آزمون به طور پایدار بیان می شود، استانداردسازی می شود. برای جلوگیری از رخداد خطاهای بیشتر در زمینه کمی سازی داده های بیان، ارزیابی ژن های کنترل درون زاد کاندید برای هر نمونه آزمایش ضروری است. در این مطالعه بیان ژن های microRNA-16 و snRNA-U6 در رده های سلولی سرطانی کبد تحت تیمار با کورکومین دندروزومی به منظور تعیین کنترل درون زاد مناسب برای مطالعات سنجش بیان microRNA ها مرتبط با کورکومین دندروزومی ارزیابی شد.

مواد و روش ها: رده های سلولی مورد نظر توسط کورکومین دندروزومی تیمار شدند. ورود کورکومین دندروزومی به رده های سلولی HepG2 و HuH-7 با تصویربرداری توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. RNA از نمونه های مورد نظر استخراج و سنتز cDNA با روش افزودن دم پلی A انجام شد. سپس توسط روش RQ-PCR سنجش بیان صورت گرفت. **نتایج:** نتایج نشان داد U6 یا ترکیبی از U6 و miRNA-16 برای HuH-7 و miRNA-16 برای HepG2 در این شرایط تیمار برای ژن کنترل درون زاد مناسب است.

نتیجه گیری: در مجموع می توان از این ژن های کنترل درون زاد به دلیل عدم تغییر بیان معنی دار و پایداری بیان بین نمونه های آزمون، برای سنجش بیان microRNA ها تحت تیمار با کورکومین دندروزومی در این رده های سلولی استفاده کرد.

کلیدواژگان: microRNA، RQ-PCR، ژن کنترل درون زاد، کورکومین دندروزومی، سرطان کبد

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، صفحات: ۶۷-۸۲

مقدمه

آن ها در کنترل ترجمه از سال ۱۹۹۳ شروع به وزیدن کرد و ۲۰ سال است که ادامه دارد و شدت می یابد. miRNA ها RNA های

کشف RNA های کوچک در یوکاریوت ها طوفانی عظیم بود که با کشف میکرو RNA ها (miRNAs یا miRs) و نقش

ژن کنترل درون‌زاد در مطالعات بیان miR ها تحت تیمار با کورکومین

آن‌ها با روش‌های نوین درمانی اشاره کرد. کورکومین (Curcumin) مستخرج از گیاه کورکوما لونگا (Curcuma Longa) یکی از این ترکیبات است که با استفاده از نانوحامل‌ها و فائق آمدن بر مشکل حلالیت و ضعف آن در ورود به سلول، می‌تواند انتخاب مناسبی در درمان سرطان‌های مقاوم به درمان‌های موجود باشد. همان‌طور که سرطان یک بیماری چندعاملی است، برای درمان آن به ترکیباتی که توانایی هدف‌گیری اجزای متعدد درون سلولی را دارد، نیازمندیم. اغلب ترکیبات شیمی‌درمانی حال حاضر یک هدف درون سلولی دارد این در حالی است که آغاز و پیشروی سرطان با اختلال در صدها ژن و مسیرهای پیام‌رسانی همراه است که نشان‌دهنده نیاز مبرم به داروهایی با چندین هدف برای غلبه بر سرطان است. از آنجایی که کورکومین توانایی تنظیم مسیرهای درون سلولی مختلفی را دارد انتخاب مناسبی برای درمان و پیش‌گیری از سرطان است. ترکیب کورکومین و نانوحامل دندروزومی به نام کورکومین دندروزومی یا نانوکورکومین براساس مطالعات انجام شده توسط محققان حاضر آثار معنی‌داری در مهار سرطان به‌صورت در بدن (in vivo) و در محیط آزمایشگاهی (in vitro) نشان داده است [۱۹-۲۸]. بنابراین تحقیقات بیشتر برای روشن‌سازی هرچه بیشتر تأثیر نانوکورکومین در مسیرهای متعدد سلولی می‌تواند پیشبردی در راستای استفاده بالینی این ترکیب باشد. تا به حال تحقیقی مبنی بر تعیین کنترل درون‌زاد مناسب در سلول‌های سرطان کبد صورت نگرفته است و همچنین بررسی ارتباط نانوکورکومین و نمایه بیان miR در سرطان کبد مطالعه نشده است. تعیین ژن کنترل درون‌زاد مناسب مقدمه‌ای بر چنین مطالعه‌ای است. با توجه به مطالعات فراوان در زمینه تعیین ژن کنترل درون‌زاد، یک کنترل درون‌زاد مشترک برای انواع بافت، تیمار یا بیماری‌ها معین نشده است، بنابراین برای جلوگیری از رخداد خطا در زمینه کمی‌سازی داده‌های بیان، ارزیابی ژن‌های کنترل درون‌زاد کاندید برای هر نمونه آزمایش ضروری است. دو ژن کنترل داخلی مرسوم microRNA-16 و snRNA-U6 (small nuclear

غیر کد شونده ۱۸-۲۵ نوکلئوتیدی، رده جدیدی از مولکول‌های کوچک RNA غیر کد کننده درون‌زاد است که بیان ژن را در سطح پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن تنظیم می‌نماید [۱، ۲]. از زمان کشف RNA های کوچک غیر کد کننده lin-4 و let-7 (که امروزه به عنوان miR شناخته می‌شود)، در کائوهابدیتیس الگانس (Caenorhabditis elegans) [۳، ۴]، تاکنون صدها توالی miR در دامنه وسیعی از موجودات، از گیاهان تا انسان، شناخته شده است. برای ژنوم انسان ۱۰۰۰ ژن رمز کننده miR که حدوداً یک درصد ژنوم را شامل می‌شود، تخمین زده می‌شود. به نظر می‌رسد این miR ها تنظیم بیان یک سوم ژنوم انسانی را بر عهده داشته باشد. هر miR تقریباً ۲۰۰ رونوشت را به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم هدف قرار می‌دهد، این در حالی است که یک ژن رمز کننده پروتئین نیز می‌تواند با بیش از یک miR تنظیم شود [۵]. نقش کلیدی miR ها به عنوان تنظیم کننده‌های فرآیندهای مختلف سلولی نظیر زمان‌بندی تکوینی (Developmental Timing)، تمایز بافتی، تکثیر سلولی، تکوین اندام، تداوم توانایی سلول بنیادی (زمان‌بندی تکوین: Developmental Timing)، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis)، تومورزایی، تهاجم، متاستاز (Metastasis) و رگ‌زایی به اثبات رسیده است [۴، ۶]. بیان نابه‌جای miR ها به دلیل تغییرات ژنتیک، اپی ژنتیک و نقص در ماشین پردازش آن‌ها در بسیاری از سرطان‌های انسانی گزارش شده است و شواهد مستدلی در این زمینه مبنی بر نقش کلیدی miR ها به عنوان ژن سرطان‌زا یا سرکوب‌گر تومور در توسعه بسیاری از بدخیمی‌های انسانی وجود دارد [۷-۹]. این مولکول‌ها در سرطان‌زایی کبد که از سرطان‌های با تشخیص ضعیف و مقاوم به درمان است [۱۰]، هم نقش قابل توجهی بازی می‌کند [۱۱-۱۸]. به دلیل عدم پاسخ به درمان مناسب در سرطان کبد استفاده از روش‌های درمانی جدید می‌تواند اهمیت داشته باشد. از روش‌های درمانی حال حاضر مورد توجه می‌توان به استفاده از ترکیبات غذایی سنتی زیست‌فعال مستخرج از گیاهان و ترکیب

مشاهده کورکومین داخل سلول با میکروسکوپ

فلورسنت

برای تأیید جذب کورکومین در داخل سلول می‌توان از خاصیت فلورسانسی ذاتی مولکول کورکومین به‌عنوان شناسه استفاده کرد. بدین منظور سلول‌ها در پلیت کشت داده می‌شوند، سپس به مدت ۴ ساعت با غلظت ۱۵ میکرومولار نانوکورکومین دندروزومی تیمار شدند، سپس محیط کشت حاوی نانوکورکومین خارج شد و بعد از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS)، عکسبرداری با میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌ها انجام گرفت.

آزمون MTT

به‌منظور سنجش میزان سمیت یک ترکیب شیمیایی یا هر ماده دیگر روی سلول، از آزمون MTT [۳-۴] و ۵-دی‌متیل تترازولیل (۲-۲) و ۵-دی فیل تترازولیوم بروماید) استفاده می‌شود. معرف MTT که یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است جذب میتوکندری سلول‌های با متابولیک فعال می‌شود و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازون (Formazan) با رنگ بنفش می‌کند که در حلال مناسب حل و میزان رنگ تولید شده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. برای هر نوع سلولی باید با رسم منحنی، رابطه متناسبی از تعداد سلول و رنگ تولید شده را به‌دست آورد. به‌طور مختصر، حدود ۸۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و ۲۴ ساعت بعد با غلظت‌های معینی از نانوکورکومین و نانوحامل (دندروزوم) تیمار داده شدند. بعد از زمان مورد نظر (۲۴ ساعت تیمار) برای تیمار، محیط هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT و محیط کشت تازه تعویض شدند و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ درصد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) بعد از تخلیه MTT به هر چاهک پلیت افزوده شد و زیست‌مانایی نسبی سلول در طول موج ۵۴۰

(RNA) در مطالعات زیادی به‌عنوان کنترل درون‌زاد ارزیابی و استفاده شده است [۲۹-۳۷] و همچنین U6 در مطالعه‌ای توسط محققان حاضر به‌عنوان کنترل داخلی در رده سلولی گلیوما (Glioma) تحت تیمار با نانوکورکومین، برای بررسی بیان miR استفاده شده است [۲۱]. در تحقیق حاضر نیز بیان این دو ژن در رده‌های سلولی سرطانی کبد تحت تیمار با نانوکورکومین برای بررسی کنترل درون‌زاد مناسب برای مطالعات سنجش بیان microRNA‌ها مرتبط با تیمار نانوکورکومین در سرطان کبد ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

ساخت حامل دندروزومی

دندروزوم‌ها (میسلهای پگیله شده مشتق از واحدهای اسید چرب اولئیک‌اسید است) برای اولین بار در ایران و توسط گروه تحقیقاتی حاضر طراحی و ساخته شده است. نحوه آماده‌سازی نانوکورکومین دندروزومی در مطالعه‌های قبلی این محققان توضیح داده شده است [۲۰، ۲۱].

کشت سلول

در تحقیق حاضر از رده‌های سلولی HepG2 و HuH-7 هپاتوما (خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Streptomycin- Penicillin) در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد رشد داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد و ۰/۰۲ درصد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) پاساژ داده شدند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد.

ژن کنترل درون‌زاد در مطالعات بیان miR ها تحت تیمار با کورکومین

(خشک شدن کامل رسوب حلالیت آن را کاهش می‌دهد) در نهایت رسوب در آب تیمار شده با DEPC حل شد و نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. برای ماندگاری و حفظ RNA انتقال و نگهداری نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. کلیه مراحل در زیر هود شیمیایی انجام گرفت و به منظور به حداقل رساندن فعالیت آنزیم RNase کلیه محلول‌ها روی یخ نگهداری و جابه‌جایی مواد روی یخ انجام شد.

بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده

پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش‌های طیف سنجی نوری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. بررسی غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری یک روش کمی است و می‌توان غلظت و خلوص نمونه RNA و آلودگی آن با پروتئین و ترکیبات فنولی را با استفاده از جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ (برای جذب اسید نوکلئیک)، ۲۸۰ (برای جذب پروتئین) و ۲۳۰ (برای جذب فنول) نانومتر بررسی کرد. نمونه RNAیی که از نظر شیمیایی دست نخورده باشد و از نظر زیستی کیفیت استاندارد داشته باشد، الگوی باند ویژه‌ای روی ژل آگارز نشان می‌دهد. حضور باندهای RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده سالم و دست نخورده بودن RNA است. نمونه‌هایی با کیفیت عالی، حداقل اسمیر (Smear) را در بالا، بین و پایین باندهای مذکور نشان می‌دهد و شدت باند ۲۸S تقریباً دو برابر باند ۱۸S است. فقدان باندهای واضح RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده تجزیه نمونه RNA توسط آنزیم RNase است، به خصوص اگر حالت اسمیر محدود به بخش تحتانی ژل باشد.

واکنش رونویسی معکوس برای ساخت cDNA

برای ژن‌های microRNA

برای تبدیل RNA به cDNA (Complementary DNA) نیاز به آغازگر (Primer) برای جفت شدن با RNA است و

نانومتر توسط صفحه‌خوان پلیت ۹۶ خانه (96well plate reader) (TECAN، سوئیس) تعیین شد. نسبت جذب در سلول‌های گروه تیمار به گروه کنترل میزان بقای سلول‌ها یا زیست‌مانایی آن‌ها در هر غلظت را نشان خواهد داد. غلظتی که در آن ۵۰ درصد از سلول‌ها توسط نانوکورکومین کشته شدند تحت عنوان غلظت کشنده در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از ۳ آزمایش مجزا به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (Mean $\pm$ SD) ارائه شد.

استخراج RNA تام سلولی

لیز سلول‌ها با واکنش‌گر TRIzol (Invitrogene، آمریکا) صورت گرفت. مراحل استخراج RNA طبق روش کار شرکت سازنده انجام شد. به طور مختصر، ابتدا لیز کامل سلول‌ها با TRIzol در دمای اتاق به مدت ۵-۱۰ دقیقه انجام شد. بعد از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم، همگن‌سازی مخلوط با سر و ته کردن شدید به مدت ۱۵ ثانیه صورت گرفت. میکروتیوب در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در اثر سانتریفوژ سه لایه ایجاد می‌شود. RNA در لایه بالایی، پروتئین در لایه میانی و DNA در لایه پایینی حضور دارد. به همین دلیل برای جلوگیری از آلودگی با پروتئین و DNA، حدود ۹۰ درصد لایه بالایی به آرامی به تیوب جدید منتقل شد. ایزوپروپانل (Isopropanol) به اندازه حجم مایع انتقال یافته، اضافه شد و محلول به آرامی مخلوط شد و محلول به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- انکوبه شد. نمونه در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. لایه رویی تخلیه و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد (تهیه شده با آب تیمار شده با DEPC (Diethylpyrocarbonate) افزوده شد و ورتکس (Vortex) مخلوط تا کنده شدن رسوب ته میکروتیوب انجام شد. نمونه در دور ۷۸۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی با وارونه کردن تیوب روی دستمال کاغذی تخلیه شد. سپس رسوب به طور نسبی در دمای اتاق به مدت چند دقیقه خشک شد.

توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) ایجاد گردد. آغازگری که برای سنتز اولین رشته cDNA استفاده می‌شود می‌تواند به‌طور اختصاصی به مورد هدف متصل شود یا به همه RNAها متصل شود. RNA استخراج شده با استفاده از TRIzol به علت احتمال آلودگی با DNA نمونه تحت تیمار با DNaseI (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) قرار گرفت. برای ساخت cDNA در این تحقیق از کیت استفاده شد. باید توجه شود که کلیه مراحل باید با وسایل و محلول‌های عاری از RNase انجام شود. برای ساخت cDNA از کیت PARSEGENOME MiR-Amp kit استفاده شد. تکثیر microRNA به کمک Real-time PCR یکی از پر کاربردترین روش‌ها در حوزه تحقیقاتی microRNA است. اساس این روش مشابه روش‌های معمولی Real-time PCR است، با این تفاوت که به‌واسطه کوچکی اندازه microRNAها راه کارهای خاصی برای این منظور ارایه شده است. افزودن یک دم polyA به miRNAهای مورد نظر یکی از این شیوه‌هاست که در کیت PARSE GENOME MiR-Amp kit (ایران) نیز از همین روش برای تکثیر miRNAها استفاده شده است. مرحله افزودن پلی A شامل: بافر آنزیم پلی A پلیمریز 10X (2 میکرولیتر)، ATP (2 میکرولیتر)، آنزیم پلی A پلیمریز، RNA (1/5-2 میکروگرم) و در نهایت رساندن به حجم کلی 20 میکرولیتر توسط آب عاری از RNase است. تمامی مواد فوق با کمک پیپت کردن به آرامی با یکدیگر مخلوط و بعد از چرخاندن و ته‌نشست ترکیبات در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و به مدت 10 دقیقه انکوبه می‌شود. محصول فوق قبل نگهداری در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد به مدت حداکثر 6 ماه است. مرحله ساخت رشته اول cDNA شامل: تهیه بافر واکنش 5x (2 میکرولیتر)، مخلوط dNTP (10 میلی‌مولار، 1 میکرولیتر)، آنزیم RT (0/5 میکرولیتر)، آغازگرهای سنتز miR (10 پیکومولار، هرکدام 1 میکرولیتر)، RNA حاوی پلی A از مرحله قبل (500 نانوگرم) و در نهایت رساندن به حجم کلی 10 میکرولیتر توسط آب عاری از RNase بود. که تمامی مواد فوق

با کمک پیپت کردن به آرامی با یکدیگر مخلوط شد و در نهایت اسپین شد و در دمای 43-45 درجه سانتی‌گراد و به مدت 60 دقیقه انکوبه شد و سپس برای غیرفعال‌سازی آنزیم RT به مدت 10 دقیقه انکوباسیون در دمای 70 درجه سانتی‌گراد لازم است. محصول فوق در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد به مدت حداکثر 2 ماه قابل نگهداری است.

واکنش RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

پس از سنتز cDNA، از واکنش Real time RT-PCR و سیستم Eva green (ROX) برای سنجش کمی بیان ژن‌ها استفاده شد. مواد مورد استفاده شامل مخلوط HOT Solis qPCR plus ROX (EvaGreen® FIREPOL® 5X)، Bio Dyne (استونی) و آغازگرهای مستقیم و معکوس برای هر دو miR-16 و U6 بود که از شرکت پارس ژنوم تهیه شد. DNA الگو (cDNA سنتز شده)، و دستگاه Real Time PCR (ABI 7500) برای واکنش Real time RT-PCR استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی مطابق جدول ۱ اجرا شد.

جدول ۱ شرایط دمایی و زمانی در سنجش Real-time Quantitative PCR

مرحله	چرخه	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
واسرشتگی اولیه	۱	۹۵	۱۵ دقیقه
واسرشتگی		۹۵	۱۵ ثانیه
اتصال	۴۰	۶۰	۲۰ ثانیه
گسترش		۷۲	۳۰ ثانیه
گسترش نهایی	۱	۷۲	۵ دقیقه

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism5 و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One Way Analysis of Variance: ANOVA) و آزمون تی نمونه‌های مستقل (T-test Unpaired)

ژن کنترل درون‌زاد در مطالعات بیان miRها تحت تیمار با کورکومین

بررسی غلظت مناسب تیمار سلول‌های سرطانی

با نانوکورکومین (کورکومین دندروزومی)

آزمون MTT انجام شد و نمودار حاصل از آن در شکل ۲ قابل مشاهده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با ANOVA یک طرفه اثر معنی‌دار سمیت نانوکورکومین ($P < 0.0001$) و عدم سمیت دندروزوم روی این رده‌های سلولی در تیمار ۲۴ ساعت در بازه غلظت ۰ تا ۳۰ میکرومولار روی هر دو رده سلولی را نشان داد. مقدار IC_{50} برای نانوکورکومین در سلول‌های سرطانی هپاتوما حدود ۲۴ میکرومولار به دست آمد. سپس برای تیمار غلظتی معادل IC_{50} استفاده شد.

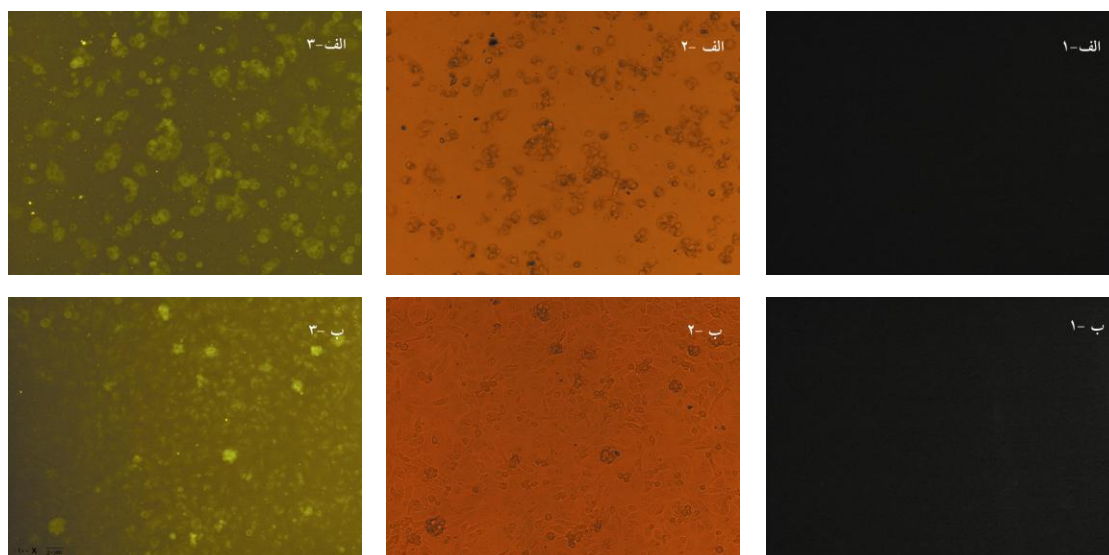
بین نمونه‌های کنترل و تیمار انجام شد.

نتایج

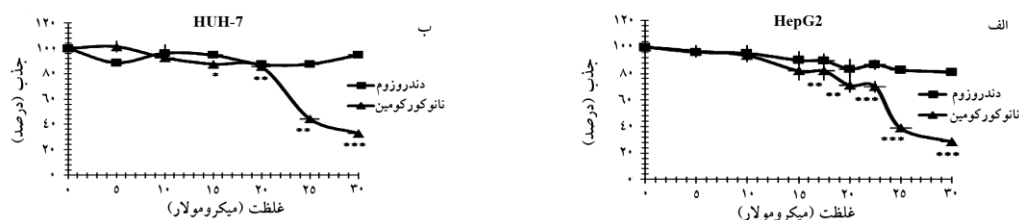
مشاهده کورکومین داخل سلول با میکروسکوپ

فلورسنت

به منظور تأیید جذب کورکومین داخل سلول، ورود آن توسط میکروسکوپ فلورسانس، به دلیل خاصیت فلورسانس ذاتی کورکومین بررسی شد. سلول‌های سرطانی با غلظت ۱۴ میکرومولار به مدت ۳ ساعت تیمار شدند، سپس از آن‌ها عکسبرداری شد.



شکل ۱ مشاهده جذب سلولی کورکومین با میکروسکوپ؛ تصاویر از دوده سلولی هپاتوما؛ (الف) تصویر کنترل، (۲) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های HepG2 و (۳) تصویر میکروسکوپ فرابنفش از سلول‌های HepG2، (ب) (۱) تصویر کنترل، (۲) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های HuH-7 و (۳) تصویر میکروسکوپ فرابنفش از سلول‌های HuH-7 است. تصاویر نشانگر ورود کورکومین به سلول‌هاست و مقدار کمی از آن به صورت کریستال بین سلول‌ها مشاهده می‌شود. (بزرگمایی ۱۰۰×)



شکل ۲ بررسی اثر سمیت نانوکورکومین و دندروزوم؛ (الف) رده سلولی HepG2 و (ب) رده سلولی HuH-7؛ در این بازه غلظت نانوکورکومین به‌طور معنی‌داری زیست‌مانایی ($P < 0.0001$) سلول‌های سرطانی هپاتوما را کاهش می‌دهد ولی دندروزوم اثر سمیت معنی‌داری روی سلول‌ها ندارد. (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)

استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین و سلول‌های کنترل برای بررسی بیان ژن‌ها

سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه با غلظت مناسبی از نانوکورکومین تیمار شدند، بعد از زمان مورد نظر با استفاده از تریزول RNA از سلول‌های کنترل و تیمار استخراج شد. برای بررسی درستی RNA استخراج شده، وجود باندهای ۲۸S، ۱۸S و ۵S روی ژل آگارز بررسی شد که نشان دهنده درستی RNAهای استخراج شده بود و هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ بین ۱/۸-۲ بود که نشان دهنده عدم آلودگی‌های پروتئین و فنول است، همچنین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر نشان دهنده غلظت RNA مورد نظر است. بنابراین نتایج به دست آمده نشان دهنده آن بود که RNAی استخراج شده می‌تواند با اطمینان بالا در

مراحل بعدی تحقیق استفاده شود.

تجزیه و تحلیل بیان hsa-miR-16 و snRNA- U6 در سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین و سلول‌های کنترل

چرخه حد آستانه بیان ژن‌های U6 و miR-16 در هر دو رده سلولی در نمونه‌های کنترل و تیمار با نانوکورکومین در جداول ۲ و ۳ مشخص شده است. میانگین به همراه انحراف معیار برای تمام موارد چرخه‌های حد آستانه ژن‌ها در نمونه‌های کنترل و تیمار با نانوکورکومین و در تکرارهای تکنیکی و زیستی در جدول ۴ قابل مشاهده است. نتایج نشان می‌دهد تغییرات U6 در رده سلولی HuH-7 و miR-16 در رده سلولی HepG2 تغییرات کمتر و پایداری بیشتری دارد. البته در هر دو رده سلولی U6 بیان بالاتری نسبت به miR-16 دارد که این اختلاف بیان در رده سلولی HuH-7 محسوس تر است.

جدول ۲: چرخه حد آستانه (Cycle threshold: Ct) بیان ژن‌های U6 و miR-16 در رده سلولی HuH-7

نمونه	ژن	Ct	Ct	تکرار تکنیکی*	تکرار زیستی*
کنترل	MiR-16	۱۶/۳۹۰۶۵	۱۹/۹۹۳۲	تکرار تکنیکی	تکرار زیستی
تیمار	MiR-16	۱۶/۵۳۳۹۱	۱۹/۵۶۱۸	تکرار تکنیکی	
کنترل	MiR-16	۱۸/۶۷۲۴۱	۱۸/۱۸۳۳	تکرار تکنیکی	
تیمار	MiR-16	۱۹/۳۲۹۱۲	۱۸/۵۰۹۰	تکرار تکنیکی	تکرار زیستی
کنترل	U6	۱۴/۸۰۰۴	۱۴/۵۰۱۱	تکرار تکنیکی	
تیمار	U6	۱۴/۹۱۲۱	۱۵/۰۵۹۳	تکرار تکنیکی	
کنترل	U6	۱۴/۲۷۴۷	۱۴/۸۶۶۵	تکرار تکنیکی	تکرار زیستی
تیمار	U6	۱۴/۷۱۰۳	۱۵/۴۶۰۳	تکرار تکنیکی	

* تکرار تکنیکی: منظور از این تکرار، تکرار مراحل تکنیکی آزمایش است و حاصل Real time PCR متمایز از نمونه‌های یکسان است.
* تکرار زیستی: منظور از این تکرار، تکرار مراحل تیمار سلولی و نمونه‌های مختلف برای Real time PCR است.

جدول ۳: چرخه حد آستانه بیان ژن‌های U6 و miR-16 در رده سلولی HepG2

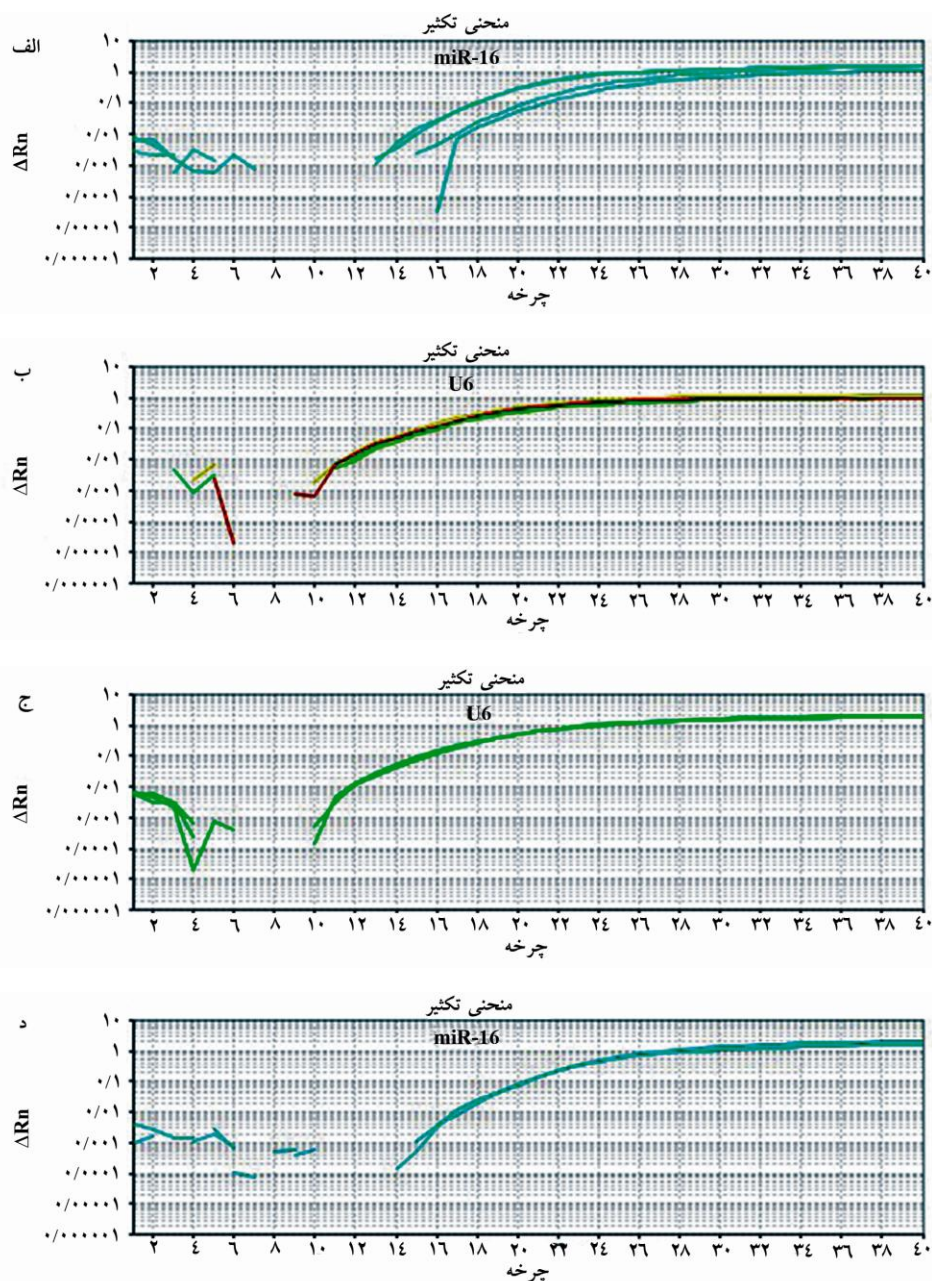
نمونه	ژن	Ct	Ct	تکرار تکنیکی*	تکرار زیستی*
کنترل	MiR-16	۱۹/۰۷۰۸	۱۸/۷۳۱۹	تکرار تکنیکی	تکرار زیستی
تیمار	MiR-16	۱۸/۶۶۰۳	۱۸/۸۹۹۵	تکرار تکنیکی	
کنترل	MiR-16	۱۸/۸۶۷۰	۱۸/۶۹۳۱	تکرار تکنیکی	
تیمار	MiR-16	۱۸/۸۶۲۴	۱۸/۸۸۶۰	تکرار تکنیکی	تکرار زیستی
کنترل	U6	۱۶/۹۱۹۰	۱۵/۸۸۶۷	تکرار تکنیکی	
تیمار	U6	۱۷/۹۶۰۳	۱۵/۷۷۲۹	تکرار تکنیکی	
کنترل	U6	۱۷/۴۰۲۸	۱۶/۲۲۱۶	تکرار تکنیکی	تکرار زیستی
تیمار	U6	۱۸/۷۷۸۵	۱۶/۲۲۲۰	تکرار تکنیکی	

* تکرار تکنیکی: منظور از این تکرار، تکرار مراحل تکنیکی آزمایش است و حاصل Real time PCR متمایز از نمونه‌های یکسان است.
* تکرار زیستی: منظور از این تکرار، تکرار مراحل تیمار سلولی و نمونه‌های مختلف برای Real time PCR است.

ژن کنترل درون‌زاد در مطالعات بیان miR ها تحت تیمار با کورکومین

جدول ۴ میانگین و واریانس تغییرات بیان ژن‌های U6 و miR-16

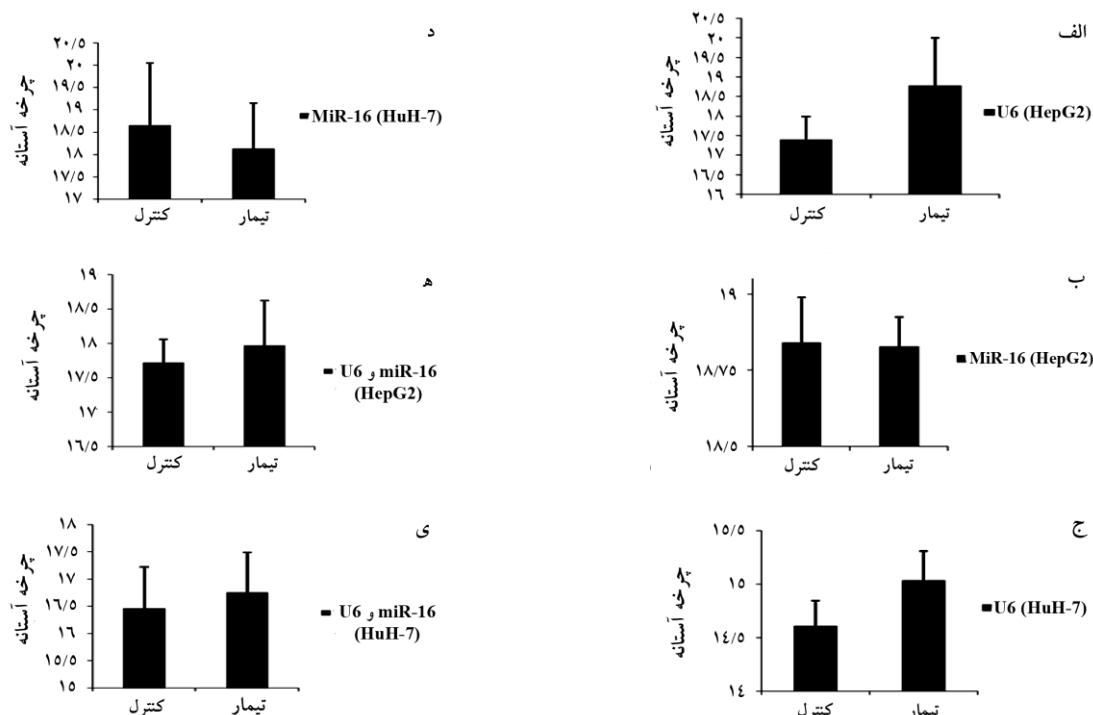
ردۀ سلولی	U6	MiR-16	MiR-16 & U6
کنترل (HuH-7)	$14/610.68 \pm 0/23787$	$18/30989 \pm 1/290781$	$16/46028 \pm 0/764325$
تیمار (HuH-7)	$15/03555 \pm 0/274774$	$18/48346 \pm 1/19157$	$16/75948 \pm 0/733172$
کنترل (HepG2)	$0/591186 \pm 16/60753$	$0/09718 \pm 18/82705$	$17/71729 \pm 0/344185$
تیمار (HepG2)	$17/18275 \pm 0/230153$	$0/074735 \pm 18/764$	$17/97338 \pm 0/62344$



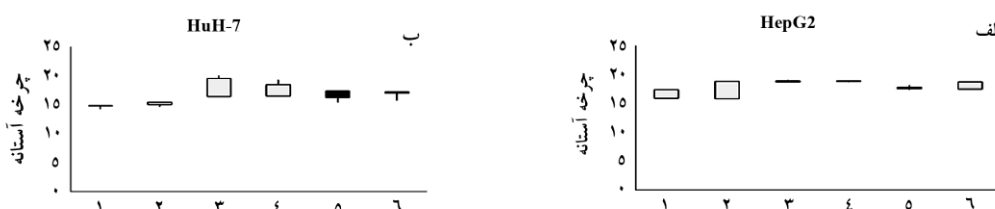
شکل ۳ منحنی تکثیر ژن‌های U6 و miR-16 در رده‌های سلولی هیپاتوما؛ (الف) بیانگر منحنی‌های تکثیر ژن miR-16 و (ب) بیانگر منحنی‌های تکثیر ژن U6 در رده سلولی HuH-7، (ج) بیانگر منحنی‌های تکثیر ژن U6 و (د) بیانگر منحنی‌های تکثیر ژن miR-16 در رده سلولی HepG2 است.

بیان ژن‌های miR-16 و snRNA-U6 در نمونه‌های بیمار و کنترل همان‌طور که در شکل ۵ هم مشخص شده است، تفاوت معنی‌داری ندارند و در همه موارد $P > 0.05$ است. البته با توجه به منحنی‌های تکثیر در شکل ۴ و نمودار شکل ۶ می‌بینیم دامنه تغییرات برای U6 در بین نمونه‌های کنترل و بیمار HuH-7 و دامنه تغییرات برای miR-16 در بین نمونه‌های کنترل و بیمار HepG2 کمتر

است و در واقع می‌توان گفت که U6 در شرایط بیمار با نانوکورکومین در سلول‌های HuH-7 پایدارتر است و می‌تواند به‌عنوان یک کنترل درون‌زاد مناسب در مجموعه آزمون مرتبط به‌کار رود، همچنین miR-16 در شرایط بیمار با نانوکورکومین در سلول‌های HepG2 پایدارتر است و می‌تواند به‌عنوان یک کنترل درون‌زاد مناسب در مجموعه آزمون مرتبط به‌کار رود.

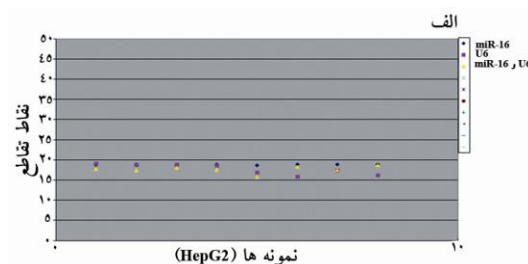


شکل ۴ تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های U6 و miR-16 در رده‌های سلولی هپاتوما با نمودار ستونی؛ در تصاویر (الف) بیان U6 و (ب) بیان miR-16 در HepG2، (ج) بیان U6 و (د) بیان miR-16 در HuH-7، به‌طور ترکیبی میانگینی از بیان U6 و miR-16 در رده سلولی (ه) HepG2 و (و) HuH-7 قابل مشاهده است. در نمودارهای بیان ژن‌های U6 و miR-16 بین نمونه‌های کنترل و بیمار شده با نانوکورکومین با توجه به میانگین و انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) قابل مشاهده است.



شکل ۵ تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های U6 و miR-16 در رده‌های سلولی هپاتوما با نمودار جعبه‌ای؛ در تصاویر (الف) HepG2، نمونه‌ها شامل: ۱: بیان U6 در نمونه کنترل، ۲: بیان U6 در نمونه بیمار، ۳: بیان miR-16 در نمونه کنترل، ۴: بیان miR-16 در نمونه بیمار، ۵: میانگین بیان U6 و miR-16 در نمونه کنترل و ۶: میانگین بیان U6 و miR-16 در نمونه بیمار. (ب) در HuH-7، نمونه‌ها شامل: ۱: بیان U6 در نمونه کنترل، ۲: بیان U6 در نمونه بیمار، ۳: بیان miR-16 در نمونه کنترل، ۴: بیان miR-16 در نمونه بیمار، ۵: میانگین بیان U6 و miR-16 در نمونه کنترل و ۶: میانگین بیان U6 و miR-16 در نمونه بیمار. بیان ژن‌های U6 و miR-16 بین نمونه‌های کنترل و بیمار شده با نانوکورکومین با توجه به حداقل و حداکثر تغییرات (Min to Max) قابل مشاهده است.

ژن کنترل درون‌زاد در مطالعات بیان miR ها تحت تیمار با کورکومین



شکل ۶ نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار BestKeeper؛ (الف) رده سلولی HepG2، (ب) رده سلولی HuH-7

داده‌های Real time PCR به صورت Excel، تجزیه و تحلیل داده‌های هر دو ژن miR-16 و snRNA-U6 و همچنین Ct های میانگین دو ژن توسط این نرم‌افزارها انجام شد. نتایج بررسی توسط نرم‌افزار NormFinder نشان‌دهنده انتخاب ژن miR-16 (ارزش پایداری یا Stability Value = ۰/۰۳۵) برای رده سلولی HepG2 و استفاده ترکیبی از هر دو ژن miR-16 و snRNA-U6 برای رده سلولی HuH-7 (با ارزش پایداری یا Stability Value = ۰/۰۰۹) بود.

نتایج بررسی داده‌ها توسط نرم‌افزار BestKeeper نشانگر انتخاب ژن miR-16 ($P=0/021$) برای رده سلولی HepG2 و ترکیبی از هر دو ژن برای رده سلولی HuH-7 ($P=0/01$) بود.

تغییرات بیان miR-29a نسبت به بیان ژن‌های miR-16، U6 و ترکیبی از آن‌ها

تغییرات بیان miR-29a نسبت به بیان ژن‌های miR-16، U6 و ترکیبی از آن‌ها نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان این miR با عملکردهای مهارکنندگی تومور در رده سلولی HuH-7 و کاهش غیر معنی‌دار آن در رده سلولی HepG2 بود (جدول ۵).

استفاده ترکیبی از هر دو ژن هم می‌تواند به عنوان کنترل درون‌زاد، اطلاعات دقیق‌تر در مطالعه بررسی بیان ژن‌های miR به صورت مشترک و مقایسه‌ای در هر دو رده سلولی ارائه دهد. این نوع به کارگیری ترکیبی ژن‌های کنترل درون‌زاد خطای ایجاد شده در کاربرد مجزای هر کدام را کاهش می‌دهد. همان‌طور که در نمودار شکل ۶ قابل مشاهده است دامنه تغییرات U6 در HepG2 و دامنه تغییرات miR-16 در HuH-7 با به کارگیری ترکیب این دو ژن در هر دو رده سلولی نسبت به کاربرد مجزای آن‌ها کاهش یافته است.

تجزیه و تحلیل بیان miR-16 و snRNA-U6 در سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین و سلول‌های کنترل توسط نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder

از نرم‌افزارهای انتخاب ژن‌های کنترل درون‌زاد براساس پایداری بیان آن‌ها بین نمونه‌های مورد آزمایش می‌توان به نرم‌افزارهای BestKeeper و NormFinder اشاره کرد که در مطالعات فراوانی برای انتخاب ژن کنترل داخلی مناسب از میان کاندیدهای مورد بررسی استفاده شده است. پس از صدور

جدول ۵ تغییرات بیان miR-29a نسبت به بیان ژن‌های U6، miR-16 و ترکیبی از آن‌ها

رده سلولی	miR-29a نسبت به U6	miR-29a نسبت به miR-16	miR-29a نسبت به miR-16 و U6
HuH-7	۲/۹۴۴۲±۱/۲۵۷۴	۲/۴۰۴۶±۰/۷۱۲۶	۲/۵۹۶۲±۰/۶۷۴
HepG2	۰/۱۰۳۶±۰/۴۴۳۳	۰/۴۶۵۶±۰/۰۳۳۷	۰/۵۸۴۳±۰/۴۴۵۳

بحث

مطالعات بررسی بیان miR با استفاده از RQ-PCR (time Real-quantitative PCR) باید با انتخاب دقیق ژن کنترل درون زاد مناسب برای استانداردسازی داده‌ها انجام شود. استانداردسازی برای اطمینان از کمی‌سازی دقیق این مولکول‌های جذاب کوچک زیستی صورت می‌گیرد. هدف استانداردسازی به حداقل رساندن واریانس داده‌هاست که برای نمایان کردن تغییرات زیستی معنی‌دار در کنار افزایش دقت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها است. استفاده از برخی ژن‌های کنترل داخلی بسیار مرسوم است و محققین از آن‌ها برای استانداردسازی داده‌های بیان ژن استفاده می‌کنند. در حالی که با توجه به این نکته که حتی ژن‌های مرسوم مانند GAPDH یا β -actin در نمونه‌های مختلف تا ۱۰ برابر یا بیشتر اختلاف بیان دارند [۱۹، ۲۰]، برای هر مطالعه بین یک تا سه ژن برای کنترل داخلی برای هر نمونه مورد آزمایش باید ارزیابی شود. در مطالعات متعددی snRNA، snoRNA و خود miRها به عنوان ژن کنترل درون زاد در مطالعات بیانی miRها استفاده می‌شود. این مطالعات تا به امروز شامل U6، 5S، 18S یا miR-16 یا LET-7A است [۳۱-۳۳]. اختلاف زیاد در بیان ژن‌های مورد نظر بین نمونه‌های مورد آزمایش می‌تواند نسبت به استانداردسازی ضعیف سازگار باشد و در نتیجه کلی خلل معنی‌داری وارد نسازد، اما در مورد اختلافات کم، این مسئله به طور یقین بسیار مؤثر و معنی‌دار خواهد بود و روی نتیجه کلی می‌تواند تأثیر معکوس نشان دهد. با توجه به مطالعه کالین (Calin) و کورک (Corce)، توانایی miRها در تنظیم اهداف متعدد در مسیر یکسان، تأثیر زیستی آن‌ها را چندین برابر تشدید می‌کند [۳۵]. در نتیجه تغییرات نسبی جزیی miRها اهمیت فراوانی خواهد داشت. بنابراین استانداردسازی بیان آن‌ها با کنترل‌های درون زاد مناسب دارای اهمیت است. یک کنترل درون زاد برای برخی آزمایش‌ها مناسب است ولی استفاده بیش از یک کنترل داخلی برای سنجش اطلاعات هرچه دقیق‌تر تغییرات بیان مفید خواهد بود. مطالعه هیدی (Heidi) و

همکاران نشان داد، استفاده از خود ژن‌های miR شامل miR-191، miR-103 و miR-17-5P در بررسی بیان miR در برخی بافت‌های سرطانی و طبیعی برای کنترل درون زاد مناسب است و حتی نسبت به ژن‌هایی مانند U6 و 5S شرایط بهتری در این نمونه‌ها دارند [۳۶]. در مطالعه پاملا (Pamela) و همکاران، ژن‌هایی از miR (miR-16، miR-21، miR-10b، miR-26b و let-7) و snRNA (RNU19، RNU48) و Z30 برای کنترل درون زاد در نمونه‌های طبیعی و تومور خوش خیم و بدخیم سرطان پستان بررسی شد [۳۷]. نتایج آن‌ها نشان داد miR-16 و let-7 از پایداری بیشتری در بین نمونه‌ها برخوردارست. در مطالعه‌ای هم مک‌درموت (McDermott) و همکاران استفاده ترکیبی از miR-16 و miR-425 برای استانداردسازی داده‌ها را پیشنهاد کردند و ارزیابی آن‌ها این ترکیب را بهتر از استفاده به تنهایی از snRNA-U6 و miR در نمونه‌های خون و بافت تومور پستان نشان داد [۳۸]. با وجود نقش مهارکنندگی رشد سلول‌های سرطانی کبد با افزایش بیان miR-16، این ژن تحت تیمار با نانوکورکومین در رده‌های سلولی سرطانی کبد در این مطالعه تغییر بیان معنی‌داری نداشت. قابل توجه است که این ژن در سلول‌های HepG2 بیان پایدار و با ثبات بیشتری نسبت به U6 تحت تیمار با نانوکورکومین داشت. این مسئله می‌تواند به دلیل چند هدفی بودن کورکومین در هدف‌گیری مولکول‌های متعدد در مسیر مقابله با سرطان باشد و این ژن را به عنوان کنترل درون زاد مناسب در مجموعه مورد آزمایش در رده سلولی HepG2 در معرض توجه قرار دهد. به هر حال در ارتباط با بررسی ژن‌های کنترل درون زاد تحت تیمار دارویی مطالعات زیادی در دسترس نیست و در اغلب پژوهش‌های مربوط به این موضوع ژن‌های مرسوم، بدون ارزیابی ویژگی‌های کنترل درون زاد به عنوان ژن مرجع استفاده شده‌است. در مطالعه حاضر miR-16 و snRNA-U6 بیان بالا و تغییرات غیرمعنی‌داری ($P > 0.01$) را در این دو رده سلولی تحت تیمار با نانوکورکومین نشان داد. البته محققان حاضر

ژن کنترل درون‌زاد در مطالعات بیان miR ها تحت تیمار با کورکومین

ژن نداشت. این مسئله می‌تواند ناشی از اختلاف کم بین حالت‌های مختلف این ژن‌ها به‌عنوان کنترل درون‌زاد باشد. گرچه مطالعات بیشتر و بررسی بیان طیف وسیعی از ژن‌های snRNA ها، snoRNA ها و miR های دیگر تحت تیمار نانوکورکومین نتایج دقیق‌تری را در پی خواهد داشت. نتایج این تحقیق می‌تواند پایه مطالعات مرتبط با اثر نانوکورکومین روی بیان ژن‌های miR در سرطان کبد قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجویی مصوب گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی و امکانات آن دانشگاه صورت گرفت. با سپاس از کلیه اعضای گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس، به تمامی محققین مسبر مقابله با سرطان تقدیم می‌گردد.

پیشنهاد می‌کنند استفاده ترکیبی از این دو ژن برای کنترل درون‌زاد برای تجزیه و تحلیل بیان miR در رده‌های سلولی سرطانی کبد تحت تیمار با نانوکورکومین هم می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. در بررسی دقیق‌تر با توجه به دامنه تغییرات چرخه‌ای بیانی هر دوی این ژن‌ها در شرایط تیمار با ترکیب دارویی مورد نظر بررسی حاضر، نانوکورکومین و بررسی‌های تغییرات چرخه‌ها در نرم‌افزارهای Bestkeeper و Normfinder، منجر به نتیجه‌گیری دقیق‌تر و انتخاب مناسب‌تری در این زمینه شد که به‌طور کل می‌توان گفت snRNA-U6 یا استفاده ترکیبی از این دو ژن در HuH-7 و miR-16 در HepG2 تحت تیمار شرایط پایدارتری دارد. در صورت استفاده از هر دو رده سلولی در یک مطالعه استفاده ترکیبی از هر دو این ژن‌ها برای کاهش خطا مناسب است. البته در این مطالعه همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود بررسی تغییرات بیان miR-29a نسبت به ژن‌های U6، miR-16 یا ترکیبی از آن‌ها تفاوتی در نتیجه‌گیری از تغییرات نسبی بیان این

منابع

- [1] Cullen BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 2004; 102(1): 3-9.
- [2] Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 2008; 18(1): 113-21.
- [3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- [4] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-6.
- [5] Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3(3): e85.
- [6] Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; 51: 25-43.
- [7] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(4): 259-69.
- [8] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;

- 435(7043): 834-8.
- [9] Babashah S, Soleimani M. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer* 2011; 47(8): 1127-37.
- [10] Yao Z, Mishra L. Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(18): 1691-8.
- [11] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 647-58.
- [12] Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 2009; 28(40): 3526-36.
- [13] Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res* 2009; 15(16): 5073-81.
- [14] Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69(3): 1135-42.
- [15] Wang B, Majumder S, Nuovo G, Kutay H, Volinia S, Patel T, Schmittgen TD, Croce C, Ghoshal K, Jacob ST. Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology* 2009; 50(4): 1152-61.
- [16] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, Zhuang SM. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51(3): 836-45.
- [17] Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, Suzuki T, Croce CM, Patel T. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3): 957-66.
- [18] Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM, Dejean A.. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(1): 264-9.
- [19] Teiten MH, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Curcumin-the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins (Basel)* 2010; 2(1): 128-62.
- [20] Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Int Immunopharmacol* 2012; 12(1): 226-34.
- [21] Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, Najafi F, Babaei E. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 403-17.
- [22] Sarbolouki MN, Parsaee S, Kosary P. Mixed

- micelle proliposomes for preparation of liposomes containing amphotericin B, in-vitro and ex-vivo studies. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000; 54(3): 240-6.
- [23] Sadeghizadeh M, Ranjbar B, Damaghi M, Khaki L, Sarbolouki MN, Najafi F, Parsaee S, Ziaee AA, Massumi M, Lubitz W, Kudela P, Paukner S, Karami A. Dendrosomes as novel gene porters-III. *J Chem Technol Biotechnol* 2008; 83: 912-20.
- [24] Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoobi MM, Karami A, Lohrasbi T. Dendrosomes: a novel family of vehicles for transfection and therapy. *J Chem Technol Biotechnol* 2000; 75: 919-22.
- [25] Alizadeh AM, Khaniki M, Azizian S, Mohaghheghi MA, Sadeghizadeh M, Najafi F. Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier--curcumin. *Eur J Pharmacol* 2012; 689(1-3): 226-32.
- [26] Tahmasebi Mirgani M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Mowla SJ. Dendrosomal curcumin induced apoptosis by suppression of pluripotency genes in 5637 bladder cancer cells. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*, 2013; 16(1): 23-39. (Persian)
- [27] Panahi A, Nakhaisistani R, Sadeghizadeh M. Evaluation of Apoptosis Induction on Gastric cancer AGS Cells Made by Polymer Nano Curcumin. *Police Teb J* 2012; 3(1): 200-7. (Persian)
- [28] Zamani M, Sadeghizadeh M, Behmanesh M. Dendrosomal curcumin upregulates the expression of long non-coding RNA gene MEG3 in U87MG glioblastoma cells. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*, 2014. In press. (Persian)
- [29] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): RESEARCH0034.
- [30] Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2000; 2(3): 143-7.
- [31] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3753-6.
- [32] Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P, Hassan SS, Kim CJ. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(3): 261.e1-6.
- [33] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67(18): 8699-707.
- [34] Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel

- biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006; 5: 24.
- [35] Calin GA, Corce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-66.
- [36] Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008; 14(5): 844-52.
- [37] Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 76.
- [38] McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One* 2013; 8(12): e83718.