کاهش سطح بیان microRNA-21 در سلول‌های HEK293T و محیط شرطی شده‌ی آن‌ها در پیش‌برد درمان سرطان کولورکتال

مریم دولتشاهی[۱]، احمدرضا بهرامی[۱،۲،۳]، مریم مقدم متین[۱،۲،۳]*

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۲] گروه پژوهشی تشخیص‌ها و درمان‌های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی ، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[۳] گروه پژوهشی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی،سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

matin@um.ac.ir
Maryam.dsh@gmail.com

چکیده

سرطان کولورکتال به‌عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان، با شیوع بالای خود، نظر دانشمندان را به‌منظور کشف سازوکارهای موثر این بیماری به خود جلب کرده است. اگرچه ظهور روش‌های درمانی جدید مانند درمان‌های هدفمند، زمینه را برای پاسخگویی بهتر فراهم آورده است، لزوم کشف نشانگرهای زیستی جدید و کارآمدتر به‌منظور تشخیص به‌موقع، معرفی روش‌های درمانی مؤثرتر و افزایش پاسخ بیماران به درمان بیش‌ازپیش احساس می‌شود. ازاین‌رو هدف قرار دادن microRNAs که پس از رونویسی نقش اساسی را در تنظیم‌های سلولی بر عهده‌دارند، از جمله miR-21 که در سرطان‌های بسیاری همچون کولورکتال افزایش سطح بیان را نشان می‌دهد، می‌تواند گزینه‌ای امیدبخش باشد. در این پژوهش، ضمن سنجش بیان miR-21 در رده‌ی سلول سرطانی کولورکتال RKO، تلاش شده است بیان miR-21 بر اساس روش ترنسفکشن مستقیم miRzip-anti-miR-21 در رده‌ی سلولی HEK293T کاهش داده شود. ارزیابی مقدماتی سلول‌های HEK293T با روش real-time PCR کاهش بیان miR-21 را پس از ترانسفکت نشان داد. به‌نظر می‌رسد سلول‌های HEK293T به دلیل ظرفیت بالای ترانسفکت شدن و تکثیر و سطح بیان پایه‌ی کم miR-21، می‌توانند به‌عنوان ابزارهایی قدرتمند جهت انتقال مقادیر بالای anti-miR-21 آزاد به سلول‌های هدف در درمان‌های هدفمند سرطان‌هایی همچون کولورکتال با بیان بالای miR-21 به کارگرفته شوند.

کلمات کلیدی

سرطان کولورکتال، MicroRNA-21، HEK293T

مقدمه

سرطان به‌عنوان مجموعه‌ای پیچیده از بیماری‌ها با الگوهای متنوع ژنتیکی (۵) در جایگاه دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان قرار می‌گیرد (۷). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸ (www.who.int)، یکی از هر شش مرگ ثبت‌شده به دلیل سرطان اتفاق می‌افتد. سلول‌های سالم به‌وسیله‌ی عوامل ژنتیکی (مانند خطاهای همانندسازی و ویروس‌های سرطان‌زا) و یا اپی‌ژنتیکی در اندام‌های مختلفی از بدن به سلول‌های سرطانی تغییر پیدا می‌کنند (۱٤).

سرطان کولورکتال در مرتبه‌ی دومین عامل مرگ‌ومیر مرتبط با سرطان در ایالات‌متحده‌ی آمریکا قرار می‌گیرد (۱۰). شیوع این سرطان در ایران به دلیل تغییرات سبک زندگی و عادات غذایی ناسالم رو به فزونی گذاشته است (۹). در این میان ابتلا به بیماری‌های التهابی روده و سوابق وراثتی در نزدیکان درجه اول نیز در ردیف عوامل مؤثر قرار می‌گیرند (٦).

آزمون‌های تشخیصی در سرطان کولورکتال به دو شکل تهاجمی (شامل کولونوسکوپی و سیگموئیدوسکوپی) و غیر تهاجمی (از طریق آزمون مدفوع و بررسی نشانگر های توموری اختصاصی) انجام می‌شود (www.cancer.gov). هتروژن بودن بیماری و مقاومت‌های دارویی روند درمان‌های سرطان کولورکتال را با مشکلات زیادی مواجه کرده اند. ازاین‌رو نیاز به کشف و معرفی نشانگرهای زیستی مناسب‌تر به‌عنوان ابزارهایی کارآمد در تشخیص زودهنگام بیماری و هم‌چنین در توسعه روش‌های درمانی هدفمند و متناسب با هر بیمار (پزشکی فردی) احساس می‌شود. به‌عنوان مثال، در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال سنجش‌های مولکولی بررسی الگوهای جهش در ژن‌های *KRAS, BRAF, NRAS* و*PIK3C* به منظور انتخاب روش درمانی مناسب مورد بررسی قرار می‌گیرند (۱۱،۱۳و۱۵). طی چند سال اخیر ضمن بررسی ارتباط تغییر پروفایل بیانی microRNAs با گسترش تومور، این توالی‌های کوچک غیر کدکننده نیز به‌عنوان یکی دیگر از نشانگرهای زیستی سرطان معرفی شدند (۸).

MicroRNAs توالی‌های کوتاه حدود ۲۵–۱۸ نوکلئوتیدی هستند که نقش تنظیمی مهمی را از طریق مهار ترجمه و یا تخریب رونوشت ژن‌ها ایفا می‌کنند (۳). MiR-21 به‌عنوان انکوژن در ۳۱ نوع سرطان ازجمله ریه، پستان و کولورکتال افزایش بیان نشان داده است (۱و٤) که با مهار ژن‌های هدف، منجر به افزایش تکثیر، تهاجم، مهاجرت و حفظ بنیادینگی سلول‌ها می‌شود و درنهایت زمینه را برای گسترش سرطان فراهم می‌آورد. بنابراین هدف قرار دادن و کاهش آن می‌تواند یکی از اهداف درمانی در بهبود بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال محسوب شود.

رده‌ی سلولی human embryonic kidney 293 (HEK293) به دلیل سهولت در ترانسفکشن، کشت و نگهداری آسان در محیط آزمایشگاهی، تکثیر بالا، سهولت دست‌کاری و مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی، کاربرد وسیعی درزمینه‌ی تولید ویروس و پروتئین‌های نوترکیب و حتی تولید سلول‌های بنیادی القایی پرتوان دارد (۲و۱۲). ازاین‌رو در مطالعه‌ی پیش‌رو با بررسی بیان miR-21 و کاهش آن در سلول HEK293T کاربرد آن به‌عنوان یک منبع مناسب در تسهیل سلول درمانی سرطان کولورکتال مورد ارزیابی قرارگرفت.

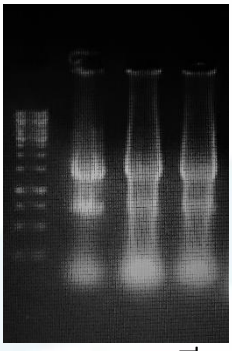
مواد و روش‌ها

سلول‌های RKO و HEK293T به ترتیب در محیط کشت RPMI 1640 و DMEM High glucose شامل ۱۰٪ FBS در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور درصد مطلوب از رطوبت کشت داده شدند. وکتور miRzip anti-miR-21 خریداری‌شده از شرکت System Biosciences به همراه وکتور کنترل آن (scrambled) به‌منظور ترانسفکت سلول‌های HEK293T با روش کلسیم کلراید مورداستفاده قرار گرفت. استخراج RNA تام با کیت ریز مولکول دانا و سنتز cDNA با کیت PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis (TaKaRa) و real-time PCR با استفاده از TB Green™ Premix Ex Taq™ (TaKaRa) انجام گرفت.

نتایج و بحث

به‌منظور بررسی سطح بیان miR-21، ابتدا سلول‌های HEK293T مورد ترانسفکت با وکتور های anti-miR-21 و scrambled (به‌عنوان کنترل) قرار گرفتند. موفقیت‌آمیز بودن مراحل انجام‌شده از طریق بررسی نور سبز منتشرشده از سلول‌ها و تیمار انتخابی پیورومایسین نشان داد که درصد بالایی از سلول‌ها توانسته‌اند وکتور موردنظر را دریافت کرده و بیان کنند.

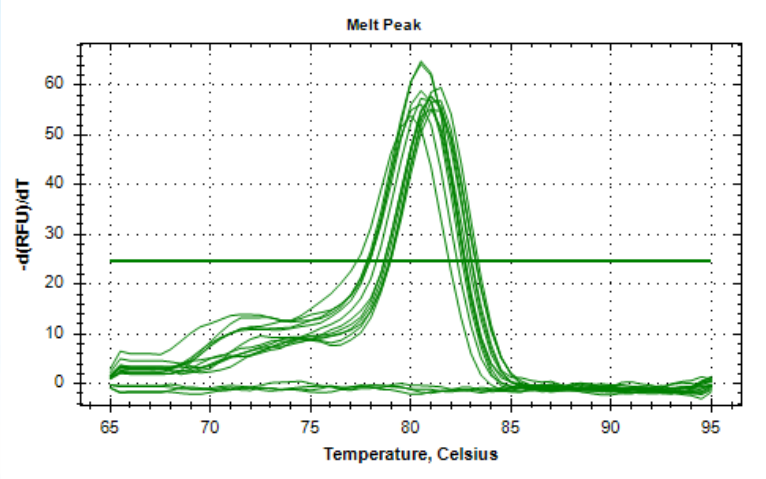
رده سلولی سرطان کولون RKO نیز به‌عنوان یکی از سلول‌های دارای بیان بالای miR-21 مورد ارزیابی قرار گرفت. کیفیت RNA تام استخراج‌شده به کمک ژل آگارز ۱٪ سنجیده شده و حضور باندهای 28s و 18s تایید شد (تصویر ۱).



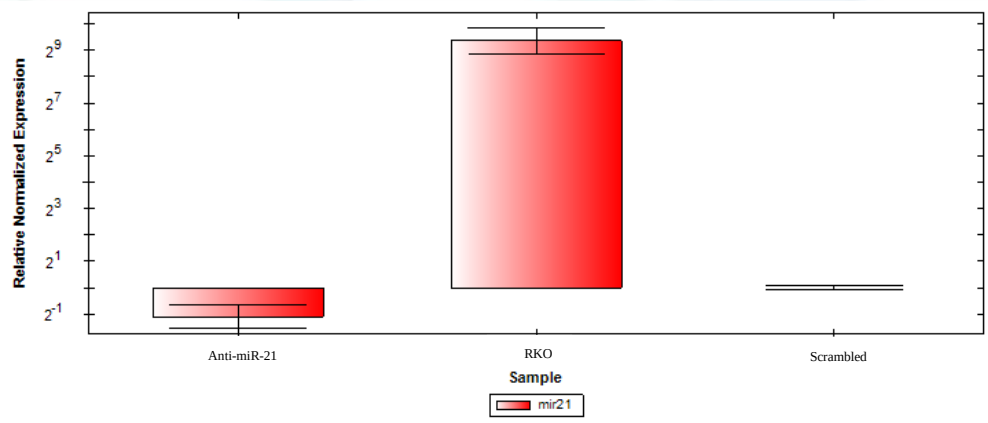
تصویر۱: RNA تام استخراج شده از سلول‌های RKO و سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با وکتورهای scrambled و anti-miR-21

سنتز cDNA به دلیل کوتاه بودن توالی‌های miR-21 با کاربرد آغازگرهای stem loop همراه شد تا طول cDNA هدف را تا حدود ٦٠ باز افزایش دهد. بررسی‌های real-time PCR نشان دادند که حامل anti-miR-21 توانست با کاهش سطح miR-21 در سلول هدف عملکرد مناسبی از خود نشان دهد (تصاویر ۲و۳). به‌علاوه نسبت به سلول سرطانی RKO با بیان بالای miR-21 سلول‌های HEK293T میزان بیان پایه‌ی اندکی از آن را نشان دادند.

در چند سال اخیر، کاربرد سلول‌های HEK293T با هدف انتقال انواع وکتور، در مهار رشد تومور و رگ‌زایی سرطان معده گزارش شده است (١٦). بر این اساس، سلول‌های HEK293T و conditioned medium آن احتمالا می‌توانند برای آزمون‌های عملکردی بعدی با دارا بودن ظرفیت بالای تکثیر و پذیرش وکتور ازیک‌طرف و حضور anti-miR-21 آزاد در سلول و محیط خارجی از طرف دیگر، به‌عنوان یکی از منابع غنی در پیشبرد مقابله با مجموعه سرطان‌های دارای بیان بالای miR-21 ازجمله کولورکتال به کار گرفته شوند.



تصویر ۲: منحنی ذوب مربوط به بیان miR-21 به روش real-time PCR



تصویر۳: سنجش بیان miR-21 در سلول‌های RKO و HEK293T پس از ترانسفکت با وکتورهای anti-miR-21 و scrambled (با دو تکرار از هر نمونه، سطح بیان ژن هدف با normalized $2^{-\Delta\Delta Ct}$ شده است)

منابع

1- **Bansode, R., Khatiwada, J., Losso, J. and Williams, L.** (2016). "Targeting microRNA in cancer using plant-based proanthocyanidins". *Diseases*, ***4***(2): 21

2- **Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S. and Kshirsagar, R.** (2016). "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives". *Critical Reviews in Biotechnology*, ***36***(6): 1110-1122.

3- **Ghildiyal, M. and Zamore, P.D**. (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe". *Nature Reviews Genetics*, ***10***(2): 94-108.

4- **Gong, B., Liu, W.W., Nie, W.J., Li, D.F., Xie, Z.J., Liu, C., Liu, Y.H., Mei, P. and Li, Z.J.** (2015). "MiR-21/RASA1 axis affects malignancy of colon cancer cells via RAS pathways". *World Journal of Gastroenterology: WJG*, ***21***(5): 1488-1497.

5- **Greaves, M., & Maley, C. C.** (2012). "Clonal evolution in cancer". *Nature*, ***481***(7381): 306–13

6- **Johnson, C.M., Wei, C., Ensor, J.E., Smolenski, D.J., Amos, C.I., Levin, B. and Berry, D.A.** (2013). "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors". *Cancer Causes & Control*, ***24***(6): 1207-1222.

7- **Marappan, S., Subramaniyan, A.** (2012). "Antitumor activiy of methanolic extract of cynodon dactylon leaves against ehrlich ascites induced carcinoma in mice". *Journal of Advanced Scientific Research*, **3**(1): 105-108.

8- **Peng, Q., Zhang, X., Min, M., Zou, L., Shen, P. and Zhu, Y.** (2017). "The clinical role of microRNA-21 as a promising biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis". *Oncotarget*, ***8***(27): 44893-44909.

9- **Rafiemanesh, H., Pakzad, R., Abedi, M., Kor, Y., Moludi, J., Towhidi, F., Makhsosi B.R and Salehiniya, H.** (2016). "Colorectal cancer in Iran: Epidemiology and morphology trends". *EXCLI Journal*, ***15***: 738-744.

10- **Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A.** (2019). "Cancer statistics". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, ***69***(1): 7-34

11- **Vacante, M., Borzì, A.M., Basile, F. and Biondi, A.**(2018). "Biomarkers in colorectal cancer Current clinical utility and future perspectives". *World Journal of Clinical Cases*, ***6***(15): 869-881.

12- **Wang, L., Zhu, H., Wu, J., Li, N. and Hua, J**. (2014). "Characterization of embryonic stem-like cells derived from HEK293T cells through miR302/367 expression and their potentiality to differentiate into germ-like cells". *Cytotechnology*, ***66***(5): 729-740.

13- **Yiu, A.J. and Yiu, C.Y.** (2016). "Biomarkers in colorectal cancer". *Anticancer Research*, ***36***(3): 1093-1102.

14- **Yousef Ahmed, F., Carmen, A.** (2017). "Revisiting the hallmarks of cancer". *American Journal of Cancer Research*, **7**(5): 1016–1036.

15- **Zarkavelis, G., Boussios, S., Papadaki, A., Katsanos, K.H., Christodoulou, D.K. and Pentheroudakis, G.** (2017). "Current and future biomarkers in colorectal cancer". *Annals of Gastroenterology*, ***30***(6): 613-621.

16- **Zhang, H., Wang, Y., Bai, M., Wang, J., Zhu, K., Liu, R., Ge, S., Li, J., Ning, T., Deng, T. and Fan, Q.** (2018). "Exosomes serve as nanoparticles to suppress tumor growth and angiogenesis in gastric cancer by delivering hepatocyte growth factor siRNA". *Cancer Science*, ***109***(3): 629-641.

Downregulation of miR-21 in HEK293T cells and their conditioned medium in advancement of colorectal cancer treatment

Maryam Dolatshahi[1], Ahmadreza Bahrami[1,2,3], Maryam Moghaddam Matin[1,2,3*]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[2] Novel Diagnostics and Therapeutics Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

[3] Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group. Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

matin@um.ac.ir
Maryam.dsh@gmail.com

Abstract

Colorectal cancer as the second leading cause of cancer-related death with high prevalence have attracted scientists to unravel the secret of its underlying mechanisms. Although, novel therapeutics approaches like targeted therapy have shed the light on better responses, yet discovery of more effective biomarkers in order to early detection of new cases, introducing more effective therapeutic strategies and improving patient responses to therapy are required. Thus, targeting microRNAs that have pivotal roles in post-transcriptional regulation, especially miR-21 that is overexpressed in many cancers including colorectal cancer, can be a promising approach in cancer therapy. In the present study, the expression levels of miR-21 was evaluated in colon cancer cell line (RKO) and human embryonic kidney 293T cells following direct transfection of miRzip-anti-miR-21 via real-time PCR analysis. Results confirmed downregulation of miR-21 as a consequence of transfection. It could be concluded that HEK293T cells considering their proper features including low basal expression of miR-21, high transfection efficiency rate and favorable proliferation capacity are suitable means for transferring lots of intact anti-miR-21 to target cancerous cells with high expression level of miR-21.

Keywords:

HEK293T ،MicroRNA-21 ،Colorectal cancer