دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست- پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۲۵۳ – ۲۴۳ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(3): 243-253

بررسی تأثیر افزایش بیان miR-29b1 بر القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی رده سلولی HL60

کتایون احمدی [۱]، مسعود سلیمانی [۲*]، سعید کاویانی [۲]، احسان عارفیان [۳]، پرویز فلاح [۴]

[۱] گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] گروه ویروس‌شناسی، گروه بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، تهران
[۴] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز

(دریافت مقاله: ۹۱/۲/۲- پذیرش مقاله: ۹۱/۶/۱۵)

چکیده

زمینه: ریزRNAها، مولکول‌های کوچک تنظیمی غیر رمز کننده هستند که نقش‌های مهمی را در فرآیندهای مختلف زیستی همچون تکثیر، تمایز و آپوپتوزیس ایفا می‌کنند. کاهش بیان miR-29b1 در بسیاری از سرطان‌های انسانی، نشان‌دهنده نقش مهم این مولکول در تکامل بافتی و سرطان است. از آنجایی که القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شاخص مهمی در درمان آن‌هاست، در این مطالعه تأثیر افزایش بیان miR-29b1 با استفاده از ساختار لنتی ویروسی بر القای آپوپتوز در رده سلولی پرومیلوتیک HL60 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: افزایش بیان پایدار miR-29b1 با استفاده از ساختار لنتی ویروسی حاوی توالی پیش‌ساز miR-29b1 حاصل شد. سپس سلول‌های HL60 تحت تیمار ویروس قرار گرفتند. پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر آپوپتوتیک این miRNA، با استفاده از آزمون MTT، رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج، سنجش میزان کاسپاز ۳ و فلوسایتومتری انکسین مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج با نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۳ و آزمون آماری t-test آنالیز شدند. مطابق انتظار، افزایش بیان miR-29b1 باعث افزایش در القای آپوپتوزیس گردید، به‌گونه ای که آپوپتوزیس در گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل حدود ۳ برابر افزایش نشان داد. آنالیز داده‌ها نشان از معنی‌دار بودن این افزایش نسبت به گروه کنترل بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این بررسی، miR-29b1 می‌تواند آپوپتوزیس را در رده سلولی HL60 القا کند. تحریک آپوپتوزیس به‌وسیله miRNAها می‌تواند یکی از بهترین و مناسب‌ترین راه‌ها برای القای مرگ در سلول‌های سرطانی باشد. نتایج به‌دست آمده از نقش سرکوب‌گری تومور miR-29b1 حمایت می‌کند، به‌گونه‌ای که miR-29b1 صناعی می‌تواند در آینده به‌عنوان یک درمان اپی‌ژنتیک جدید به‌کار رود.

واژگان کلیدی: ریز RNA، miR-29b1 ، آپوپتوزیس، HL60، کتور لنتی ویروسی

* تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون
Email :soleim_m@modares.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

مقدمه

ریز RNAها[1]، RNAهای کوچک تنظیمی غیرکد شونده با طول حدود ۲۵-۱۷ نوکلئوتید هستند که به‌عنوان بازدارنده، نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند. این RNAها با اتصال به قسمت ۳'UTR[2] mRNA هدفشان، چه با تجزیه و تخریب کردن آن و چه از راه مهار ماشین ترجمه، از تولید پروتئین ممانعت به عمل می‌آورند (۲-۱). البته به تازگی ثابت شده است که برخی از miRNAها می‌توانند به ناحیه ORF[3] و یا حتی ۵'UTR اهدافشان متصل شوند و حتی می‌توانند بیان ژن هدفشان را افزایش دهند (۴-۳).

ریزRNAها نقش‌های مهمی را در فرآیندهای مختلف زیستی مانند تکثیر، تمایز، آپوپتوزیس و حتی مقاومت به استرس، متابولیسم چربی و ترشح انسولین ایفا می‌کنند (۵). حدود ۳۰ درصد ژن‌های کد کننده پروتئین انسانی توسط ریز RNAها تنظیم می‌شوند (۷-۶).

با توجه به نقش‌های متفاوت ریز RNAها در تنظیم رشد و تقسیمات سلولی، می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که این مولکول‌ها می‌توانند نقش مهمی را در بروز سرطان داشته باشند (۸). الگوی بیان طبیعی بسیاری از ریز RNAها در مراحل مختلف تشکیل تومورهای مختلف تغییر می‌یابد. به‌علاوه، ژن‌های بسیاری از ریز RNAهای انسانی در قسمت‌هایی از ژنوم یافت شده‌اند که با بروز سرطان‌های مختلف در ارتباطند (۱۰-۹). از این رو پروفایل بیان miRNA کل می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای تشخیص و پیش‌بینی سرطان به‌کار رود چون نسبت به پروفایل بیان mRNA پیش‌بینی بهتری نسبت به نوع و مرحله سرطان دارد (۱۱).

کاهش بیان اعضاء خانواده miR-29 در بدخیمی‌های گوناگونی از جمله سرطان ریه، سینه، CLL[4] و AML[5] گزارش شده است (۱۲). ارتباط معکوس بین سطوح این خانواده و سطوح DNA متیل ترانسفرازهای مسئول متیله کردن ژن‌های سرکوب‌گر تومور در رده‌های سلولی و بلاست‌های اولیه سلول سرطانی ریه ثابت شده است (۱۳). به طوری که وارد کردن miR-29b1 به برخی از رده‌های سلولی لوکمی میلوئیدی حاد، قابلیت زیست و تکثیر سلول را کاهش و آپوپتوز و حساسیت به شیمی درمانی را افزایش می‌دهد در واقع القاء آپوپتوز توسط miR-29b1 با فعال شدن برخی از کاسپازها و مهار ژن آنتی‌آپوپتوتیک Mcl-1 مرتبط است (۱۵-۱۴).

رده سلولی HL60 رده‌ای برگرفته از لوسمی میلوئیدی حاد است و از آنجایی که سرطان‌ها و به‌ویژه انواع لوکمی‌ها از شیوع بالایی برخوردارند، استفاده و به‌کارگیری روش درمانی بر پایه مولکولی با کمترین عوارض و بهترین پاسخ اهمیت بسیار دارد (۱۶). بنابراین در این تحقیق رده سلولی HL60 به‌عنوان مدلی برای بررسی تأثیر افزایش بیان miR-29b1 انتخاب گردید.

نقش این miRNA در مکانیسم‌های سرطان‌زایی و آپوپتوزیس به روشنی اهمیت بررسی عملکرد آن را نشان می‌دهد و شاید راهی در جهت شناخت بیشتر مکانیسم‌های سرطان بگشاید.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

سلول‌های HL60 از بانک سلولی مرکز تحقیقات و فناوری بن‌یاخته تهیه گردید. سلول‌های مذکور در محیط RPMI1640(Gibco,USA) حاوی ۱۵ درصد

[1] microRNA
[2] Untranslated region
[3] Open reading frame
[4] Chronic lymphocytic leukemia
[5] Acute myeloid leukemia

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

(FBS(Gibco، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱X) و ۲mM گلوتامین در شرایط استاندارد دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۹۵ درصد و Co2 ۵ درصد کشت داده شدند. روز قبل از تیمار سلول‌ها با ویروس، سلول‌ها شمارش شده و از نظر درصد زنده بودن[6] با تریپان بلو ارزیابی شدند که درصد زنده بودن آن‌ها رضایت بخش و حدود ۹۸ درصد بود. سپس برای آزمایشات مختلف، سلول‌ها در فاز لگاریتمی با شمارش حدود ۵×۱۰^{۵} سلول در پلیت کشت سلولی ۶ خانه کشت داده شدند. تمام آزمایشات، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با ویروس pLEX-Jred-miR29b1 به‌عنوان نمونه آزمون و تیمار گروه دیگری از سلول‌ها با ویروس pLEX-Jred خالی به‌عنوان نمونه کنترل و به صورت تکرار دو تایی انجام شد (۹).

طراحی و تولید ساختار لنتی ویروسی حاوی ژن miR-29b1

پیش‌ساز ژن miR-29b1 پس از تخلیص از DNA ژنومی انسانی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. پرایمرهای کلونینگ مورد استفاده به شرح زیر است:

Forward:5'CCGCTCGAGGAACCTTTGTCTGGGCAAC 3'
Reverse:5'CGACGCGTAGAAAGTCTGTTCATGTTCAATAC3'

توالی ژن توسط جایگاه‌های برش دو آنزیم محدودالاثر XhoI و MluI (Fermentas) داخل وکتور لنتی ویروسی pLEX-Jred کلون شد. صحت توالی ژنی توسط هضم آنزیمی محصول نوترکیب با آنزیم‌های محدودالاثر مختلف و همچنین تعیین توالی محصول تأیید شد. بعد از تأیید صحت توالی ساختار پلاسمیدی ساخته شده، برای اطمینان از اینکه این ساختار درست عمل می‌کند و مارکرها و ژن مورد نظر ما بیان می‌شود یا خیر، قبل از بسته‌بندی ویروس، این ساختار پلاسمیدی با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogene) داخل سلول‌های یوکاریوتی HEK293T ترانسفکت شد. ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، بیان مارکر Jred با میکروسکوپ فلئورسنت، بیان ژن مقاومت به پرومایسین با افزودن غلظت‌های مختلف پرومایسین به محیط و افزایش بیان ژن miR-29b1 توسط miRNA real time PCR در سلول‌های ترانسداکت شده نسبت به سلول‌های ترانسداکت نشده مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸).

به‌منظور تولید ساختار لنتی ویروسی، پلاسمید نوترکیب pLEX–Jred–miR–29b1 همراه با دو وکتور لنتی ویروسی کمکی شامل، وکتور pMD2.G حامل ژن VSV-G کدکننده پوشش ویروسی[7] و وکتور psPAX2 حامل دو ژن ویروسی pol کدکننده آنزیم‌های رونوشت بردار معکوس و اینتگراز و ژن gag کدکننده پروتئین‌های کپسید ویروسی هستند، به داخل سلول‌های HEK293T با استفاده از پروتکل کلسیم – فسفات ترانسفکت شدند. پس از جمع‌آوری سوسپانسیون ویروسی و تغلیظ آن، جهت تعیین تیتراسیون ویروس، به‌منظور به‌دست آوردن نسبت مناسب ذرات ویروسی برای یک سلول (MOI)، از روش تشخیص کمی Real Time PCR استفاده شد. از ویروس خالی بدون ژن miR-29b1 به‌عنوان نمونه کنترل در تمام آزمایشات استفاده شد.

بررسی اثر سمیت ویروس به‌وسیله MTT

به منظور بررسی اثر سمیت از آزمون MTT استفاده شد که بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول بنا شده است. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، به هر چاهک ۱۰

[6] Viability

[7] envelope

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

میکرولیتر محلول MTT (Sigma) با غلظت ۵ میلی‌گرم اضافه و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه، جهت حل شدن رسوب فورمازان به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (Merck) افزوده گردید و پس از ۳۰ دقیقه جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد.

آنالیز سلول‌ها با رنگ‌آمیزی همزمان با اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج

جهت بررسی تغییرات ریخت‌شناسی آپوپتوزیس، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۵×۱۰^{۵}) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (Sigma) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه گستره، با عدسی ۴۰x میکروسکوپ فلئورسنت، تغییرات مورفولوژیکی حداقل ۲۰۰ سلول در ۵ میدان دید تصادفی مورد مطالعه و شمارش قرار گرفت و درصد سلول‌های آپوپتوتیک نسبت به کل سلول‌ها محاسبه شد.

فلوسایتومتری با استفاده از Annexin V و PI

به‌منظور تمیز دادن سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک از یکدیگر از رنگ‌آمیزی آن‌ها با Annexin V کونژوگه شده با فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و یدید پروپایدیوم (PI) شرکت MACS استفاده شد. بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، سلول‌ها طی دو مرحله با بافر متصل شونده شسته شده و سپس ۱۰ میکرولیتر Annexin V-FITC به آن‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. پس از شستشوی مجدد سلول‌ها ۵ میکرولیتر PI اضافه و بلافاصله فلئورسنت سبزرنگ Annexin V-FITC در طول موج ۵۳۰ و فلئورسنت قرمز رنگ PI در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شد.

بررسی آپوپتوزیس به وسیله سنجش میزان کاسپاز ۳

سنجش میزان کاسپاز ۳ با استفاده از کیت شرکت Sigma انجام شد. به این‌صورت که ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، در مرحله اول سلول‌ها بعد از شستشو با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر لیزکننده لیز شدند. سپس طبق پروتکل، ۸۵ میکرولیتر بافر سنجش و ۱۰ میکرولیتر سوبسترای کاسپاز ۳ (Ac-DEVD-pNA) اضافه و پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان جذب pNA آزاد شده توسط کاسپاز ۳ در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

آنالیز آماری

تمام آزمایشات به‌صورت تکرار دوتایی انجام شد به‌جزء آزمون MTT که به‌صورت تکرار سه تایی انجام شد. داده‌ها پس از جمع‌آوری بر حسب مورد با استفاده از student t-test ویرایش ۱۳ نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc، Chicago، Il، USA)تجزیه و تحلیل شدند و $P<۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

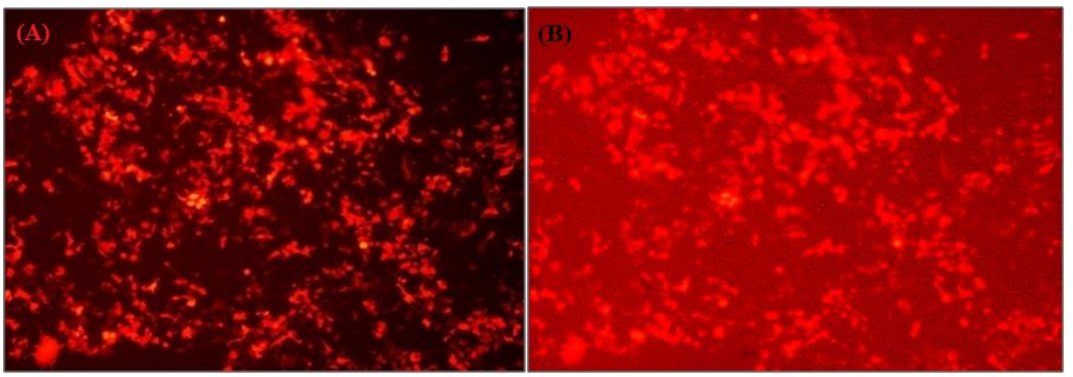
یافته‌ها

تولید پلاسمید نوترکیب pLEX- Jred - miR-29b1

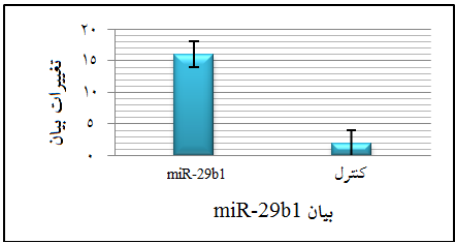
پس از طراحی و ساخت ساختار ژنی مورد نظر و تأیید توالی صحیح آن، این ساختار به منظور بررسی بیان مناسب ژن‌های آن به داخل سلول‌های HEK ترانسفکت شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است بعد از ۴۸ ساعت، مشاهده بیان مارکر Jred با میکروسکوپ فلئورسنت نشان دهنده صحت و بیان این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

مارکر با راندمان حدود ۴۰ درصد بود. بیان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک پرومایسین نیز بعد از اضافه کردن غلظت‌های مختلف این آنتی‌بیوتیک به سلول‌های تیمار شده و مشاهده مقاومت سلول‌های ترانسداکت شده در برابر آن تأیید شد. ۴۸ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، نتایج حاصل از miRNA real time PCR نیز افزایش حدود ۸ برابری در میزان بیان miR-29b1 را در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده نشان داد که تأیید کننده موفقیت در افزایش بیان این ژن با استفاده از وکتور بیانی pLEX-Jred بود (نمودار ۱).



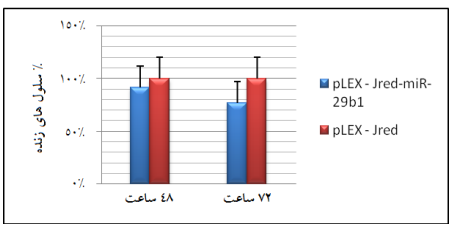
شکل ۱) (A) تصویر میکروسکوپ فلئورسنت از سلول‌های HEK ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pLEX-Jred- miR-29b1 و تأیید بیان مارکر، (B) Jred تصویر میکروسکوپ فلئورسنت از همان سلول‌ها همراه با سلول‌های ترانسداکت نشده (بزرگ‌نمایی ۱۰۰x).



نمودار۱) نتایج miRNA real time PCR. میزان افزایش بیان miR-29b1 ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب pLEX-Jred-miR29b1 در هر دو تکرار نمونه مورد آزمایش، حدود ۸ برابر بیشتر از نمونه کنترل بود که نشان‌دهنده موفقیت در افزایش بیان این ژن با استفاده از این وکتور بیانی بود (P<۰/۰۵).

سنجش MTT

میزان سایتوتوکسیسیتی ویروس pLEX-Jred-miR-29b1 بر روی سلول‌ها توسط محلول MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان جذب نوری فورمازان تولید شده توسط سلول‌های زنده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با تعداد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی ارتباط مستقیم دارد. چنانچه در نمودار ۱ مشهود است، درصد سلول‌های زنده در گروه آزمون بعد از ۴۸ ساعت حدود ۱۰ درصد، و بعد از ۷۲ ساعت حدود ۲۷ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است. به این معنا که بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌ها با ویروس به‌ترتیب درصد سلول‌های زنده ۹۱ و ۷۷ درصد بوده است که اختلاف معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان دادند.

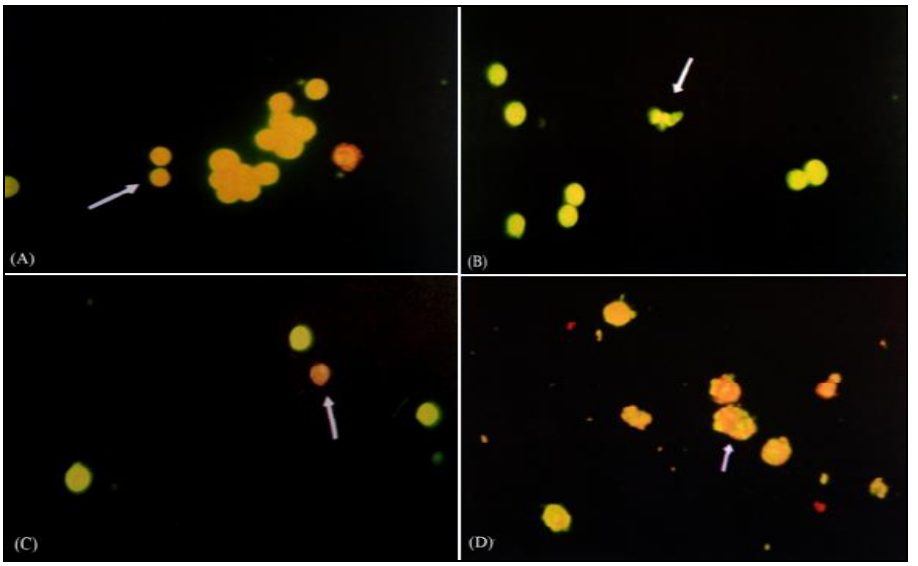


نمودار ۲) سنجش اثر سایتوتوکسیک ویروس pLEX-Jred- miR-29b1 بر سلول‌های HL60 به‌وسیله آزمون MTT. بعد از ۴۸ ساعت به‌طور میانگین در ۳ نمونه تکرار درصد سلول‌های زنده در گروه آزمون ۹۱ درصد و بعد از ۷۲ ساعت ۷۷ درصد مشاهده شد (P<۰/۰۵).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

آنالیز سلول‌های آپوپتوتیک با میکروسکوپ فلئورسنت

آکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است که توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود، وارد DNA شده و در زیر میکروسکوپ فلئورسنت یک نمای سبز رنگ به کروماتین سلول زنده می‌دهد. در حالی که اتیدیوم بروماید فقط وارد DNA سلول مرده شده و رنگ نارنجی به کروماتین سلول مرده می‌دهد. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار ویروسی سلول‌ها همزمان با اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج رنگ‌آمیزی شدند و انواع کروماتین سلول را با توجه به رنگ ایجاد شده از هم تفکیک و شمارش شد (شکل ۱). به طوری که بعد از گذشت ۴۸ و۷۲ ساعت شاهد کاهش تعداد سلول‌های زنده و افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه آزمون نسبت به نمونه کنترل بودیم. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل ۶ درصد بود در حالی که این درصد در گروه آزمون ۲۰ درصد محاسبه شد و بعد از ۷۲ ساعت، ۱۰ درصد از سلول‌های کنترل و ۳۵ درصد از سلول‌های آزمون ویژگی‌های آپوپتوتیک از خود نشان داده بودند.



شکل ۲) رنگ‌آمیزی همزمان سلول‌ها با اتیدیوم بروماید و آکریدین اورنج به‌منظور تمیز دادن سلول‌های مرده و زنده و مشاهده توسط میکروسکوپ فلئورسنت (بزرگ‌نمایی ۴۰x).
(A): سلول زنده با هسته طبیعی با کروماتین سبز رنگ. (B): سلول زنده با هسته آپوپتوتیک با کروماتین سبز رنگ ولی شدیداً متراکم و قطعه قطعه شده. (C): سلول مرده با هسته طبیعی با کروماتین نارنجی رنگ.
(D): سلول‌های مرده با هسته آپوپتوتیک با کروماتین نارنجی رنگ و با تراکم بالا و قطعه قطعه شده.

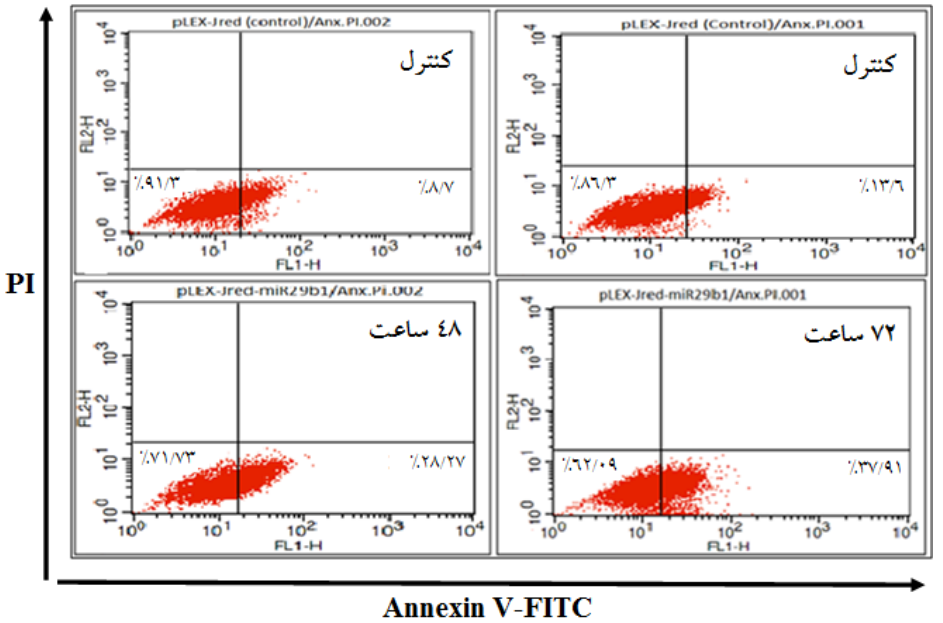
آنالیز سلول‌های آپوپتوتیک با فلوسایتومتری

بعد از تیمار سلول‌ها به‌وسیله رنگ‌آمیزی سلول‌ها با ترکیبی از Annexin V-FITC و PI امکان تشخیص سلول‌ها به‌ترتیب زیر داده شد: سلول‌های غیرآپوپتوتیک: Annexin V منفی /PI منفی، سلول‌های در مرحله اولیه آپوپتوزیس: Annexin V مثبت /PI منفی و سلول‌های در مرحله نهایی آپوپتوزیس و نکروز: Annexin V مثبت /PI مثبت.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، پس از ۴۸ ساعت درصد سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه‌های کنترل به‌طور میانگین ۹ درصد و در نمونه‌های آزمون ۲۸ درصد بود و پس از ۷۲ ساعت این درصد در نمونه‌های کنترل به‌طور میانگین ۱۳ درصد و در نمونه‌های آزمون ۳۷ درصد بود که این نشان‌دهنده‌ی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

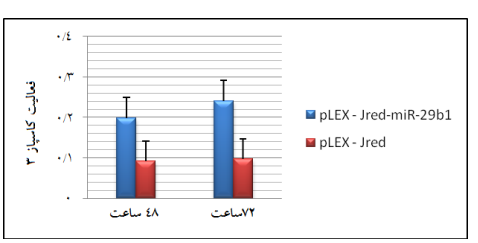
افزایش حدود ۳ برابری آپوپتوز در نمونه‌های آزمون نسبت به نمونه‌های کنترل بود.



شکل۳) فلوسایتومتری انکسین V و PI سلول‌های HL60، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسداکشن ویروس. نتایج نشان‌دهنده افزایش حدود ۳ برابری درصد سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه‌های آزمون نسبت به نمونه‌های کنترل بود.

سنجش میزان کاسپاز ۳

کاسپازها که خانواده‌ای از پروتئازها هستند نقش مهمی را در فرآیند آپوپتوزیس ایفا می‌کنند. در بین خانواده کاسپازها، کاسپاز ۳ مسئول برش و پردازش سوبستراهای مختلف و یکی از آنزیم‌های حیاتی و ضروری آپوپتوزیس است. در این مطالعه پس از تیمار و آماده‌سازی سلول‌ها، همان‌طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است، در هر دو زمان میزان کاسپاز ۳ در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل حدود ۲ برابر شده است.



نمودار۳) سنجش میزان فعالیت کاسپاز ۳. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار با ویروس pLEX-Jred- miR-29b1 بعد از ۴۸ ساعت میزان کاسپاز ۳ در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل حدود ۲/۲ برابر و بعد از ۷۲ ساعت حدود ۲/۴ برابر شده است (P<۰/۰۵).

بحث

از آنجایی که سرطان یکی از عوامل مهم و اصلی مرگ ومیر در جوامع امروز می‌باشد، درمان‌های جدید و به‌ویژه درمان‌های مولکولی می‌تواند راه‌کار مفیدتری برای درمان و حتی کمتر کردن اثرات آن باشد. درمان‌های رایج سرطان مانند شیمی درمانی و رادیوتراپی با وجود اینکه وضعیت بیمار را به‌طور نسبی بهبود می‌بخشند ولی درمان قطعی و کاملی برای آن نمی‌باشند. تحقیقات فراوانی جهت یافتن راه‌کارهای مفید و مؤثر برای درمان سرطان با کمترین عوارض و بیشترین پاسخ مناسب انجام گرفته است (۱۶ و ۱۷).

استراتژی‌های جدید درمان لوکمی شامل ایمنی درمانی، ژن درمانی، تمایز درمانی و همچنین القای آپوپتوزیس می‌باشد. القای آپوپتوزیس به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی جدید، مدنظر بسیاری از متخصصین

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

قرار گرفته است. در سه دهه گذشته شاهد پیشرفت همه جانبه روش‌های مولکولی در مطالعه بدخیمی‌های گوناگون بوده‌ایم. ویژگی های اپی‌ژنتیک غیرعادی که در بدخیمی‌ها وجود دارند توسط تکنیک‌هایی مانند سنجش متیلاسیون جزایر CpG در کل ژنوم و سنجش بروز تغییرات در پروتئین‌های هیستون قابل شناسایی می‌باشند (۱۸). عملکرد ژن‌های جهش یافته در لوکمی‌های میلوئیدی حاد که با روش‌های قدرتمند غربالگری شناسایی شده‌اند نیز قابل آنالیز می‌باشد. عملکرد این ژن‌ها در مدل‌های موشی knockout، با مکانیزم‌های مهاری RNAi، در سیستم‌های رتروویروسی و لنتی ویروسی برای افزایش بیان و توسط بسیاری روش‌های اختصاصی و نوین دیگر قابل بررسی می‌باشند (۱۹).

اما به‌طور ویژه در درمان با القای تمایز و آپوپتوز، از جالب‌ترین پیشرفت‌های اخیر کشف نقش ریز RNAها در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله القای آپوپتوزیس در رده‌های مختلف سلولی می‌باشد.

پس از کشف عملکرد ریز RNAها در تنظیم بیان ژن‌ها، قابلیت‌های این مولکول‌ها در درمان بیماری‌ها به‌کار گرفته شد (۲۰). در این رابطه راهکارهای درمانی مختلفی وجود دارد که شامل مهار به واسطه مهارکننده‌های الیگونوکلئوتیدی، جایگزینی‌های miRNA[8] و یا miRNAهای کدشونده توسط وکتورهای ویروسی هستند (۲۱). برخی از محققین بر این باورند که برخی از miRNAها می‌توانند بر همه ویژگی‌های سلول‌های بدخیم از قبیل تهاجم، رگزایی، متاستاز و آپوپتوزیس تأثیر بگذارند (۲۲).

آپوپتوزیس فرآیند پیچیده‌ای است که نقش ریز RNAهای متعددی در آن به اثبات رسیده است. برخی از miRNAها پیش برنده آپوپتوز هستند در حالی که گروهی دیگر مهار کننده آن هستند (۲۳).

عملکردهای مشخص و ثابت شده ریز RNAها به‌عنوان ژن‌های سرکوبگر تومور و یا انکوژن‌ها، نشان‌دهنده نقش حیاتی و مهم آن‌ها در تومورزایی است (۲۳). به طوری که ثابت شده است که ریز RNAهای سرکوبگری تومور تقریباً به‌طور ثابت در بیشتر سرطان‌ها کاهش بیان یافته‌اند از جمله miR-15a، miR-16-1، Let-7 و miR-145، در حالی که برخی دیگر از قبیل miR-155، miR-21 و یا خوشه ژنی miR-17-92 به‌عنوان ریز RNAهای انکوژنیک عمل می‌کنند (۲۴ و ۲۵).

خانواده miR-29 از جمله miRNAهایی هستند که در بسیاری از بدخیمی‌ها از جمله سرطان ریه، سرطان سینه، CLL و AML کاهش بیان داشته‌اند که می‌تواند نشان‌دهنده نقش آن‌ها در مهار تومورزایی باشد (۱۲). miR-29b1 مولکولی با عملکردهای گسترده سلولی از قبیل نقش در تنظیم چرخه سلولی، تمایز، پایداری ژنومی، آپوپتوزیس، چسبندگی سلولی و غیره است (۱).

در پژوهش کنونی سعی شده است اثرات پروآپوپتوتیک این مولکول با انتقال آن به‌وسیله طراحی و ساخت یک ساختار لنتی ویروسی به درون رده سلولی HL60 مورد ارزیابی قرار بگیرد. با این ساختار توانستیم به بیان پایدار و با راندمان نسبتاً بالای ژن مورد نظر برسیم. همان‌گونه که در نمودارهای حاصل از نتایج سنجش‌ها مشخص است، در تمام آزمون‌ها افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل دیده می‌شود و این ثابت کننده این مطلب است که این ریز RNA می‌تواند با القای آپوپتوز در سلول‌ها مرگ آن‌ها را افزایش دهد.

[8] miRNA replacements

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

نتایج این مطالعه با نتایج پژوهش موت (Mott) و همکاران که ثابت کرده بودند که miR-29b1 به‌طور مستقیم ژن ضد آپوپتوزی Mcl-1 را مهار و آپوپتوز را القاء می‌کند هم‌خوانی دارد، به‌طوری که مهار این miRNAها باعث افزایش در بیان ژن ضد آپوپتوزی و پایداری و دوام سلول‌های توموری می‌شود (۱۵).

گارزون (Garzon) و همکاران نیز نشان دادند که وارد کردن دوباره اعضاء خانواده miR-29 به‌ویژه miR-29b1 در vitro به رده‌های سلولی سرطان ریه که بیان داخلی miR-29b1 در آن‌ها پایین است، سبب بیان دوباره ژن‌های سرکوب‌گر تومور متیله شده و مهار رشد می‌شود که تأیید کننده یافته‌های بررسی پیش رو است (۱۲). همچنین در مطالعه‌ای وارد کردن miR-29b1 سنتتیک به داخل رده‌های سلولی K562 و Kasumi-1 و بلاست‌های اولیه AML، قابلیت زیست و تکثیر سلول را کاهش و آپوپتوز و حساسیت به شیمی درمانی را افزایش و در نتیجه قابلیت ایجاد تومور را در مدل لوکمی موشی کاهش داده است. در واقع القاء آپوپتوز توسط miR-29b1 با فعال شدن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷ و مهار Mcl-1 مرتبط است. این نتایج از نقش مهارکنندگی تومور توسط miR-29b1 حمایت می‌کند (۱۲).

در مطالعه دیگری پارک (Park) و همکاران دریافتند که miR-29b1 سطوح بیان ژن مهم و کلیدی P53 را تنظیم و آپوپتوز را در مسیر وابسته به P53 القا می‌کنند. آن‌ها پیشتر دریافته بودند که miR-29b1 به‌طور مستقیم ژن P85α و ژن CDC42 را که هر دو تنظیم کننده منفی P53 هستند تنظیم می‌کنند (۲۷). از آنجایی که در این بررسی القای آپوپتوز در سلول‌های HL60 می‌تواند نتیجه مهار ژن‌های Mcl-1، DNA متیل ترانسفرازها و سایر ژن‌های ذکر شده دخیل در مهار آپوپتوز باشد، می‌توان نتیجه گرفت که مطالعه اخیر با نتایج حاصل از تحقیقات این محققین هم‌خوانی دارد به‌طوری که می‌توان با انجام مطالعات و تحقیقات تکمیلی در آینده از این miRNA به‌عنوان یک درمان اپی ژنتیکی در انواع سرطان‌ها استفاده نمود.

پی بردن به مکانیسم‌های دقیق ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی که سبب تنظیم بیان ژن‌ها می‌شوند باعث گسترش آگاهی ما در تشخیص، درمان و مدیریت بیماری‌های مختلف از جمله سرطان خواهد شد. با توجه به توانایی‌های بالقوه miRNAها می‌توان این امید را داشت در آینده‌ای نزدیک از این مولکول‌ها به‌عنوان درمان‌های مؤثر و قطعی بهره برد. البته مطالعات تکمیلی گوناگونی لازم است تا نقش این miRNA و سایر miRNAهای دخیل در آپوپتوز به‌صورت دقیق بررسی و ژن‌های هدف آن‌ها شناسایی شوند. همچنین از آنجایی که انتقال ساختارهای ویروسی به درون موجود زنده با مشکلات فراوانی همراه است طراحی روشی که بتوان مطالعه را به‌صورت in vivo و در مدل‌های حیوانی انجام داد ارزشمند خواهد بود.

سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد کتایون احمدی رشته ژنتیک در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران می‌باشد. در ضمن بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته تشکر و قدردانی می‌نمایند.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

References:

1.Garzon R, Marcucci G, Croce C. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategics and challenges. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 775-89.
2.Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. Blood 2006; 108: 3646-53.
3.Drakaki A, Iliopoulos D. MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis. Curr Genomics 2009; 10: 35-41.
4.Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol cell 2008; 23; 30: 460-71.
5.Lee I, Ajey SS, Yook JI, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. Genome Res 2009; 19: 1175-83.
6.Shah AA, Meese E, Blin N. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes. J Appl Genet 2010; 51: 501-507.
7.He A, Zhu L, Gupta N, et al. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol 2007; 21: 2785-94.
8.Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. Annu Rev Med 2009; 60: 167-79.
9.Calin GA, Sevignani C, Dumitra CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 2999-3004.
10.Li Z, Lu J, Sun M, et al. Distict microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 15535-40.
11.Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435: 834-8.
12.Garzon R, Heaphy CE, havelange V, et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. Blood 2009; 114: 5331-41.
13.Garzon R, Liu S, Fabbri M, et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation an tumor suppressor gene rerxpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and DNMT3B and indirectly DNMT1. Blood 2009; 113: 6411-8.
14.Havelange V, Garzon R, Croce CM. MicroRNA: new players in acute myeloid leukemia. Br J Cancer 2009; 101: 743-8.
15.Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. MiR-29 regulates MCL-1 protein expression and apoptosis. Oncogene 2007; 26: 6133-40.
16.Raquel TL, Sara B, Gabriela MA, et al. MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. Eur J Cancer 2011; 47: 163-74.
17.Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. MiRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. Curr Opin Pharmacol 2010; 10: 543-50.
18.Figueroa ME, ReimersM ,Thompson RF, et al. An integrative genomic andepigenomic approach for the study of transcriptional regulation. PLoS One 2008; 3: e1882.
19.Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. Blood 2009; 113: 3655-65.
20.Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. Int J Biochem Cell Biol 2010; 42: 1273-81.
21.Esau CC, Monia BP. Therapeutic potential for microRNAs. Adv Drug Deliv Rev 2007; 59: 101-14.
22.Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.
23.Yang BF, Lu YJ, Wang ZG. MicroRNAs and apoptosis: implications in the molecular therapy of human disease. Clin Exp Pharmacol Physiol 2009; 36: 951-60.
24.Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol 2007; 302: 1-12.
25.Bandyopadhyay S, Mitra R, Maulik U, et al. Development of the human cancer microRNA network. Silence 2010; 1: 6.
26.Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. Nat Genet 2003; 33: 61-5.
27.Park SY, Lee JH, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85α and CDC42. Nat Struct Mol Biol 2008; 16: 23-9.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]

ISMJ 2014; 17(3): 243-253

Orginal Article

Effect of overexpression of miR-29b1 on induction of apoptosis in leukemic HL60 cell line

K.Ahmadi [1], M.Soleimani [2*], S.Kaviani [2], E.Arefian [3], P.Fallah [4]

[1]Department of Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, IRAN.
[2] Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN.
[3] Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Bon Yakhte Biotechnology Research Center, Tehran, IRAN.
[4] Department of Hematology, Faculty of Paramedical, Alborz University of Medical Sciences, Alborz, IRAN.

(Received 21 Apr, 2012 Accepted 5 Sep, 2012)

Abstract

Background: MicroRNAs are small non-coding regulatory molecules that are involved in diverse biological processes such as proliferation, differentiation and apoptosis. Down regulation of miR-29b1 has been found in some of cancers that indicate important roles of this molecule in histological development and cancer. Whereas induction of apoptosis in cancer cells is important for their therapy, in this study, our goal was to examine the effect of miR-29b1 over-expression on apoptosis using the lentiviral structure in HL60 cell line.

Materials and methods: Permanent overexpression of miR-29b1 was established using a lentiviral vector construct containing the precursor of miR-29b1 sequence. Then, HL60 cells treated by miR-29b1 lentivirus. 48 and 72 hours after transduction, cell proliferation inhibition was estimated by MTT assay. Detection of apoptotic cells was evaluated by EtBr/AO double staining technique and flow cytometry using Annexin V and Caspase-3 activity was measured by caspase-3 colorimetric activity assay.

Results: Data analysis was done with SPSS 13 softwer and t-test. According to our results, overexpression of miR-29b1 led to increase apoptosis. As apoptosis in the test group compared with the control group showed about 3-fold increase. Data analysis showed a significant increase compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: According to findings of present study, miR-29b1 can induce apoptosis in HL60 cell line. Apoptosis stimulation by miRNAs is probably one of the best and applicable ways to induce death in cancer cells. These data support a tumor suppressor role of miR-29b1, synthetic miR-29b1 might be used as a novel epigenetic therapy in future.

Key words: microRNA, miR-29b1, Apoptosis, HL60, lentiviral vector

***Address for correspondence*: Department of Hematology, Faculty of medical science, Tarbiat Modares University, Tehran, IRAN.
Email: soleim_m@modares.ac.ir

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-08]