DOI: 10.22122/jims.v36i477.9946 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۷۷/هفته‌ی اول تیر ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۸ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۴/۱

بررسی تأثیر مهار Long Non-Coding RNA PVT1 با استفاده از فن‌آوری Antisense LNA GapmeRs بر روی میزان تکثیر سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی

مهسا صالحی[۱]، محمدرضا شریفی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Long non-coding RNA (lncRNA)ها دسته‌ای از ملکول‌های RNA با طول ۱۰۰۰۰-۲۰۰ نوکلئوتید هستند که قابلیت ترجمه به پروتئین را از دست داده‌اند. آن‌ها در فرایندهای بیولوژیکی مختلفی نظیر تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز و پیشرفت سرطان نقش مهمی را بازی می‌کنند. سرطان خون حاد میلوئیدی، از شایع‌ترین لوسمی‌های حاد می‌باشد. شواهد نشان داده است که بیان lncRNA PVT1 در سرطان خون حاد میلوئیدی افزایش می‌یابد. مطالعه‌ی حاضر، با هدف مهار انکوژن lncRNA PVT1 با استفاده از Antisense LNA GapmeRs و بررسی تأثیر آن بر تکثیر سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی انجام شد.

روش‌ها: سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی (KG1) که طبق رده‌بندی French–American–British (FAB) به عنوان زیر گروه ۶ سرطان خون حاد میلوئیدی شناخته می‌شوند، در محیط Roswell Park Memorial Institute (RPMI) کشت داده شدند. مهار lncRNA PVT1 با استفاده از Antisense LNA GapmeRs انجام شد. سپس، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، بیان lncRNA PVT1 به روش Reverse transcription-Quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) بررسی گردید. همچنین، تکثیر سلولی با استفاده از آزمون 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5- Tetrazolium bromide (MTT) سنجیده شد.

یافته‌ها: بیان lncRNA PVT1 در۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، در گروه ترانسفکت شده با Antisense LNA GapmeRs نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. میزان تکثیر سلولی در گروه ترانسفکت شده با Antisense LNA GapmeRs نسبت به دو گروه دیگر نیز کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: مهار lncRNA PVT1 با استفاده از Antisense LNA GapmeRs می‌تواند به طور چشم‌گیری تکثیر سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی را کاهش دهد. نتایج این مطالعه، می‌تواند در طب ترجمه‌ای برای هدف درمانی در سرطان خون حاد میلوئیدی کمک کننده باشد.

واژگان کلیدی: تکثیر سلولی، RNA غیر کد کننده‌ی طویل، RNA غیر کد کننده‌ی طویل PVT1، لوسمی حاد میلوئیدی، اریترولوسمی

ارجاع: صالحی مهسا، شریفی محمدرضا. **بررسی تأثیر مهار Long Non-Coding RNA PVT1 با استفاده از فن‌آوری Antisense LNA GapmeRs بر روی میزان تکثیر سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۷): ۴۴۵-۴۳۹

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در حوزه‌ی توالی‌یابی، رازهای نوینی از دنیای RNAهای غیر کد کننده را گشوده است (۱). Long non-coding RNA (lncRNA)ها دسته‌ای از RNAهای غیر کد کننده با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند که به عنوان تنظیم کننده‌های کلیدی بیان ژن در سطح رونویسی و پس از رونویسی عمل می‌کنند (۳-۲). مشابه با Messenger RNAs (mRNAs)، lncRNA ها توسط آنزیم RNA پلیمراز II و همراه با فرایندهای پردازش و پلی‌آدنیلاسیون تولید می‌شوند (۴، ۲). Du و همکاران، با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های Ensembl و Refseq تعداد کل lncRNA های انسانی را ۱۵۸۵۷ عدد اعلام کردند (۵). lncRNA ها در شمار زیادی از فرایندهای سلولی مانند چرخه‌ی سلولی، تمایز، تکثیر وآپوپتوز تأثیر دارند (۶). به علاوه، مشخص شده است که تغییر در بیان lncRNA ها با بیماری‌های زیادی نظیر بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease)، پسوریازیس (Psoriasis) و سندرم X شکننده مرتبط است (۷، ۴). شواهد متعددی نشان داده است که در

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا شریفی

Email: mo_sharifi@med.mui.ac.ir

بسیاری از سرطان‌ها، بیان lncRNA ها تغییر یافته است و بیان تغییر یافته‌ی lncRNAها با پاتوژنز و توسعه‌ی سرطان در ارتباط است. بنابراین، تنظیم بیان آن‌ها می‌تواند نقطه‌ای برای درمان بدخیمی‌ها نظیر سرطان باشد. امروزه، مشخص شده است که lncRNAها همانند ژن‌های کد کننده‌ی پروتئین و MicroRNAها در سرطان می‌توانند به عنوان انکوژن و یا سرکوبگر تومور عمل کنند (۳).

سرطان خون حاد میلوئیدی، شایع‌ترین فرم لوسمی حاد، دومین سرطان خون شایع در جهان و سومین سرطان خون کشنده در ایران است که با تجمع سلول‌های تمایز نیافته و نابالغ در مغز استخوان به دلیل اختلال در روند طبیعی تمایز سلول‌های بنیادی میلوئیدی مشخص می‌شود (۹-۸). مطابق با رده‌بندی French–American–British (FAB)، سرطان خون حاد میلوئیدی به ۸ دسته از M0-M7 طبقه‌بندی می‌گردد که دسته‌ی M6 آن اریترولوسمی حاد انسانی می‌باشد (۱۰). اریترولوسمی حاد انسانی، یک نوع نادر از سرطان خون حاد میلوئیدی است که کمتر از ۵ درصد کل موارد سرطان خون حاد میلوئیدی را تشکیل می‌دهد. این بیماری، پیش‌آگهی بدی دارد و بقای متوسط بیماران ۹-۳ ماه است (۱۱). درحال حاضر، به علت فهم ناقص مکانیسم پاتوژنز این بیماری، هیچ گونه درمان خاصی که بتواند ملکول و یا مسیر سیگنالینگ خاصی را در این بیماران تحت تأثیر قرار دهد، وجود ندارد (۱۲-۱۱).

lncRNAها، به عنوان بازیکنان پر قدرت در عملکردهای سلولی می‌توانند به طور بالقوه‌ای به روشن شدن مکانیسم پاتوژنز این بیماری و در نتیجه، توسعه‌ی گزینه‌های درمانی جدید کمک کنند. به تازگی مشخص شده است که بیان lncRNA PVT1 در سرطان خون حاد میلوئیدی افزایش می‌یابد و منجر به افزایش رشد و تکثیر سلولی می‌گردد (۱۳).

PVT1، یک lncRNA مهم به طول ۱۹۵۷جفت باز می‌باشد که نزدیک به انکوژن MYC در محل 8q24 واقع شده است. این ناحیه‌ی ژنومی با بیولوژی انواعی از سرطان‌ها همچون لنفوم بورکیت مرتبط است (۱۵-۱۴). مطالعات متعدد بر روی lncRNA PVT1 ارتباط بالقوه‌ی بین آن و انواعی از سرطان‌ها را مشخص کرده است. این یافته‌ها، نشان می‌دهند که بیان lncRNA PVT1 در سرطان‌هایی همچون سینه، تخمدان، مثانه، معده، کبد و کلورکتال نیز افزایش می‌یابد و منجر به افزایش تکثیر سلولی، مهار آپوپتوز و مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی می‌شود (۱۴).

با توجه به نقش lncRNA PVT1 در تکثیر سلول‌های لوسمی حاد انسانی، در مطالعه‌ی حاضر فرض بر آن بود که مهار lncRNA PVT1، شاید بتواند موجب جلوگیری از تقسیم این سلول‌ها و در نتیجه، منجر به خاموشی لوسمی گردد. مهار lncRNAهای انکوژن به عنوان یک راهبرد درمانی در سرطان تا کنون در مطالعات متعددی گزارش شده است. Liu و همکاران، دریافتند که مهار انکوژن lncRNA HOTTIP در سلول‌های سرطان کلورکتال می‌تواند از طریق کاهش بیان SGK1 به طور چشم‌گیری تکثیر و مهاجرت سلولی را کاهش دهد (۱۶). به علاوه، مهار lncRNA KCNQ1OT1 در سلول‌های جدا شده از بافت توموری ریه، توانست مقاومت به داروی شیمی‌درمانی Paclitaxel را کاهش دهد (۱۷). اگر چه اغلب این مطالعات در مراحل آزمایشگاهی به سر می‌برند، اما با این حال، کارآزمایی‌های بالینی زیادی نیز در حال انجام است. به عنوان مثال، در مورد بدخیمی‌های معده‌ای- روده‌ای، پنج Antisense مختلف در حال طی مراحل بالینی هستند که از طریق هدف قرار دادن انکوژن‌هایی نظیر XIAP، bcl-2 و H-ras، می‌توانند اثرات خود در درمان سرطان را القا نمایند. همچنین، در خصوص بدخیمی‌های خونی نیز مطالعات بالینی زیادی بر روی کاربرد Antisenseها به صورت تنها و یا همراه با داروهای شیمی‌درمانی به عنوان یک راهبرد درمانی تمرکز کرده‌اند (۱۸). روش‌های مختلفی برای مهار lncRNAها مطرح شده است. Antisense LNA GapmeRs نسل جدیدی از اولیگونوکلئوتیدهای Antisense می‌باشد که پتانسیل بسیار بالایی را جهت مهار lncRNAها فراهم کرده است (۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر، مهار انکوژن lncRNA PVT1 با استفاده از Antisense LNA GapmeRs انجام شد. سپس، تأثیر آن بر تکثیر سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی -که طبق رده‌بندی FAB به عنوان زیر گروه ۶ از سرطان خون حاد میلوئیدی شناخته می‌شود-، مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

کشت سلولی: رده‌ی سلولی اریترولوسمی حاد انسانی (KG1) از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور، تهران، ایران) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) حاوی Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد و ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع با ۵ درصد CO_2 در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای حفظ سلول‌ها در مرحله‌ی لگاریتمی، سلول‌ها دو بار در هفته پاساژ داده شدند.

ترانسفکشن سلولی: ردیف نوکلئوتیدی lncRNA PVT1 با استفاده از وب سایت http://www.lncrnadb.org به دست آمد. Antisense LNA GapmeRs (Exiqon, Denmark) برای مهار PVT1 و Antisense LNA GapmeR Negative controls به عنوان شاهد منفی خریداری شد. اولیگونوکلئوتیدهای

Antisense LNA GapmeRs و Antisense LNA GapmeR Negative controls در پایانه‌ی ۵ پریم با رنگ فلورسنت 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) نشان‌دار شده بودند.

ترانسفکشن سلول‌های KG1 با استفاده از کیت PolyFect™ transfection reagent kit (Qiagen ,Germany) و بر اساس دستورالعمل این شرکت انجام شد. به صورت خلاصه، تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول در مرحله‌ی لگاریتمی در پلیت کشت شش خانه کاشته شدند و ۱/۸ میلی‌لیتر از محیط کشت RPMI بدون FBS و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک اضافه گردید. ۵ پیکومول از Antisense LNA GapmeRs با ۱۲ میکرولیتر از Polyfect™ در ۳۰۰ میکرولیتر از محیط کشت Opti-MEMI (Gibco, UK) مخلوط گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس، این مخلوط به سلول‌های KG1 اضافه گردید. پس از ۶ ساعت انکوباسیون، FBS و آنتی‌بیوتیک به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. سلول‌های ترانسفکت نشده نیز هم‌زمان با سلول‌های ترانسفکت شده با Antisense LNA GapmeRs و Antisense LNA GapmeR Negative controls کشت داده شدند. با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، ترانسفکشن سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی بیان lncRNA PVT1: به منظور تعیین کارایی مهار lncRNA PVT1 با استفاده از Antisense LNA GapmeRs، بیان lncRNA PVT1 به روش Reverse transcription-Quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) در سلول‌های KG1 بررسی گردید. برای استخراج RNA در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، از miRCURY RNA Isolation kit (Exiqon, Denmark) استفاده گردید. برای سنتز Complementary DNA (cDNA) از Universal cDNA Synthesis kit (Exiqon, Denmark) استفاده شد. با استفاده از SYBR Green master mix kit (Exiqon, Denmark) و پرایمرهای اختصاصی برای lncRNA PVT1، lncRNA qPCR انجام گردید. از Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. همچنین، از دستگاه ABI Step One Plus (ABI, USA) و روش ΔΔCt به منظور آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

بررسی تکثیر سلولی: تکثیر سلول‌های KG1 با استفاده از روش 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5- diphenyl Tetrazolium bromide (MTT) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن مورد بررسی قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر MTT (Sigma-Aldrich, USA) با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به تعداد ۵×۱۰^{۵} سلول موجود در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI اضافه گردید و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، ۲۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) به هر چاهک اضافه گردید و سپس، میزان جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

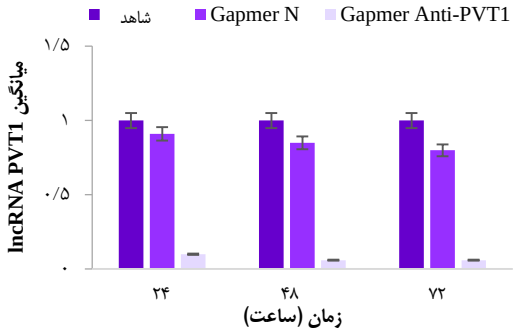
واکاوی داده‌ها: در این مطالعه، تمامی آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) واکاوی گردید. همچنین، میزان تفاوت در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

ترانسفکشن سلولی: با توجه به آن که اولیگونوکلئوتیدهای Antisense LNA GapmeRs و Antisense LNA GapmeR Negative controls با رنگ فلورسنت نشان‌دار شده بودند، میزان ترانسفکشن سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت تعیین شد. ترانسفکشن سلولی در سلول‌های KG1 به میزان ۹۰ درصد تخمین زده شد.

بیان lncRNA PVT1: برای ارزیابی بیان lncRNA PVT1 در سلول‌های KG1 ترانسفکت شده با Antisense LNA GapmeRs، Antisense LNA GapmeR Negative controls و شاهد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن، RT-qPCR انجام شد. بیان lncRNA PVT1 در هر سه زمان در گروه ترانسفکت شده با Aantisense LNA GapmeRs نسبت به سایر گروه‌ها کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت ($P < ۰/۰۱$). بالاترین سطح بیان lncRNA PVT1 در ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن مشاهده شد و سپس، در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن کاهش یافت (شکل ۱).

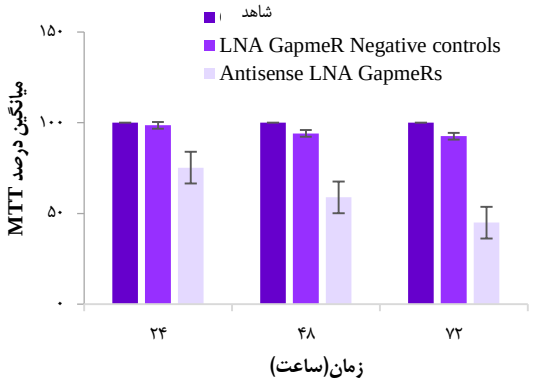
تکثیر سلولی: به منظور ارزیابی اثر مهار PVT1 بر میزان رشد و تکثیر سلول‌های KG1، آزمون MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن انجام شد. در گروه ترانسفکت شده با Antisense LNA GapmeRs تکثیر سلولی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته بود ($P < ۰/۰۱$). کمترین میزان تکثیر سلولی در زمان ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن مشاهده شد. اگر چه میزان تکثیر سلولی در گروه ترانسفکت شده با Antisense LNA GapmeR Negative controls نسبت به گروه ترانسفکت نشده کمتر بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲).



شکل ۱. بررسی بیان Long non-coding RNA PVT1 (lncRNA PVT1) به روش Reverse transcription-Quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن انجام شد. روش ΔΔCt به منظور واکاوی داده‌ها استفاده گردید. سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار در هر سه بار تکرار آزمایش می‌باشند.

بحث

خون‌سازی (هماتوپوئز) یک فرایند بسیار هماهنگ است که شامل سلسله مراتبی از مراحل تمایز سلول‌های شناخته شده‌ای است که آن را به یک سیستم ایده‌آل برای شناسایی LncRNAهای دخیل در این فرایند تبدیل کرده است (۲۰).



شکل ۲. بررسی تکثیر سلولی با استفاده از روش 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5- diphenyl Tetrazolium bromide (MTT) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن انجام شد. در هر زمان، تکثیر سلولی سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و تکثیر سلولی دیگر گروه‌ها، به صورت درصد نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده نشان داده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار در هر سه بار تکرار آزمایش می‌باشند.

مطالعات اخیر، نشان می‌دهد که LncRNAها نقش بسیار مهمی در خون‌سازی طبیعی از طریق تنظیم تکثیر و تمایز و بقای سلول و مراحل توسعه و رشد و نمو از جمله تعیین سرنوشت Hematopoietic stem cells (HSCs) و تمایز سلول‌های خونی اجدادی به رده‌های لنفوئیدی، میلوئیدی و اریتروئیدی دارند (۲۱). به علاوه، امروزه ارتباطات مهمی میان افزایش و کاهش بیان lncRNAها با سرطان های مختلفی از جمله سرطان خون حاد میلوئیدی گزارش شده است (۷).

lncRNAها در زیر گروه‌های مختلفی از لوسمی‌های حاد میلوئیدی بیان متفاوتی را از خود نشان داده‌اند. PVT1، یکی از LncRNAهای مهمی می‌باشد که بیان متفاوت آن تاکنون در بدخیمی‌های متعددی توصیف شده است (۱۴). PVT1 یک lncRNA به طول ۱۹۵۷ جفت باز است که در محل 8q24.21 قرار دارد و بیان آن در بدخیمی‌های متعددی افزایش می‌یابد (۱۵). در مطالعات متعددی، افزایش بیان PVT1 در کلورکتال، سینه، تخمدان و رحم گزارش شده است (۲۴-۲۲). در سرطان کبد، افزایش بیان lncRNA PVT1 از طریق حفاظت کردن پروتئین NOP2، از تخریب منجر به افزایش رشد و تکثیر سلولی می‌گردد (۲۵). در سرطان رحم، افزایش بیان PVT1 با پیش‌آگهی ضعیف و در سرطان کلورکتال با توسعه و پیشرفت سرطان در ارتباط می‌باشد (۲۶، ۲۴). lncRNA PVT1 در لوسمی حاد میلوئیدی نیز افزایش بیان دارد و از طریق افزایش سطح انکوژن c-MYC باعث افزایش تکثیر سلولی و کاهش میزان آپوپتوز و نکروز می‌شود (۱۳).

با توجه به نقش lncRNA PVT1 در تکثیر سلول‌های لوسمی حاد میلوئیدی، یک راهکار درمانی برای لوسمی‌های حاد میلوئیدی، مهار انکوژن PVT1 می‌باشد تا ازطریق آن از تکثیر سلول‌های لوسمیک جلوگیری شود. تا کنون، تلاش‌های زیادی برای درمان سرطان از طریق مهار lncRNAها صورت گرفته است (۱۸). روش عمده‌ای که در بیشتر این مطالعات جهت مهار LncRNAهای انکوژن مورد توجه واقع شده است، روش Small interfering RNA (siRNA) می‌باشد که با RNA-induced silencing complex (RISC) موجب شکست و تجزیه در mRNA هدف می‌شود، اما وجود مشکلاتی همچون ویژگی و کارآمدی پایین، تخریب توسط نوکلئازها و ایجاد عوارض جانبی توکسیک، منجر به کاهش کارایی و کاربرد آن‌ها در محیط‌های In vivo شده است (۲۷).

Antisense LNA GapmeRs نسل جدیدی از اولیگونوکلئوتیدهای Antisense می‌باشد که به دلیل خواصی نظیر ثبات در محیط‌های بیولوژیک، افزایش ویژگی در اتصال به هدف،

تمایل بالا به RNA هدف، عدم سمیت قابل تشخیص و فعالیت بیولوژیکی قوی، پتانسیل بسیار بالایی را جهت مهار LncRNAها فراهم کرده‌اند (۱۹).

در این مطالعه، از Antisense LNA GapmeRs برای مهار lncRNA PVT1 در رده‌ی سلولی اریترولوسمی حاد انسانی که طبق رده‌بندی FAB به عنوان زیر گروه ۶ از لوسمی‌های حاد میلوئیدی شناخته می‌شود، استفاده شد. بیان lncRNA PVT1 پس از ترانسفکشن سلولی با Antisense LNA GapmeRs به طور تقریبی به صفر رسید و این کاهش بیان، با استفاده از روش qRT-PCR تأیید شد. داده‌های آزمون MTT نشان داد که مهار PVT1 با کاهش تکثیر سلولی در ارتباط است. بیشترین تأثیر مهار PVT1 بر روی تکثیر سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی در زمان ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن مشاهده شد.

نتایج مطالعه، نقش انکوژنی lncRNA PVT1 را به عنوان کاهنده‌ی تکثیر سلولی برای اریترولوسمی حاد انسانی با مهار اختصاصی آن با استفاده از Antisense LNA GapmeRs نشان داد. به کارگیری lncRNAها در کاربردهای درمانی در مراحل اولیه به سر می‌برد، اما با توجه به پتانسیل بالای آن‌ها، انتظار می‌رود که در سال‌های آینده به عنوان وسیله‌ای در درمان سرطان در نظر گرفته شوند (۲۸).

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مهار PVT1 توسط Antisense LNA GapmeRs، می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای از تکثیر سلولی در سلول‌های اریترولوسمی حاد انسانی جلوگیری کند. بر اساس نتایج این مطالعه، احتمال می‌رود که مهار PVT1 با استفاده از Antisense LNA GapmeRs بتواند به تنهایی و یا در ترکیب با سایر روش‌های درمانی برای درمان اریترولوسمی حاد انسانی به کار رود. با این حال، مطالعات In vivo برای ارزیابی انجام‌پذیری این روش در درمان اریترولوسمی حاد انسانی لازم می‌باشد. به علاوه، در حال حاضر انتقال مؤثر Antisenseها به درون موجود زنده با مشکلات زیادی روبه‌رو می‌باشد که باید قبل از ورود به مراحل بالینی حل شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی مصوب این دانشگاه به شماره‌ی ۳۹۵۶۷۸ می‌باشد. بدین وسیله، از این دانشگاه جهت تأمین هزینه‌ی اجرای این مطالعه قدردانی می‌گردد.

References

1. Salehi M, Sharifi M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. J Cell Physiol 2018; 233(9): 6370-80.
2. Bolha L, Ravnik-Glavac M, Glavac D. Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer. Dis Markers 2017; 2017: 7243968.
3. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. Mol Cancer 2011; 10: 38.
4. Zhang H, Chen Z, Wang X, Huang Z, He Z, Chen Y. Long non-coding RNA: A new player in cancer. J Hematol Oncol 2013; 6: 37.
5. Du Z, Fei T, Verhaak RG, Su Z, Zhang Y, Brown M, et al. Integrative genomic analyses reveal clinically relevant long noncoding RNAs in human cancer. Nat Struct Mol Biol 2013; 20(7): 908-13.
6. Colombo T, Farina L, Macino G, Paci P. PVT1: A rising star among oncogenic long noncoding RNAs. Biomed Res Int 2015; 2015: 304208.
7. Hauptman N, Glavac D. Long non-coding RNA in cancer. Int J Mol Sci 2013; 14(3): 4655-69.
8. Zand AM, Imani S, Saadati M, Borna H, Ziaei R, Honari H. Effect of age, gender and blood group on blood cancer types. Kowsar Medical Journal 2010; 15(2): 111-4. [In Persian].
9. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1999; 341(14): 1051-62.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med 1985; 103(4): 620-5.
11. Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C, Tang G, Kasyan A, Luthra R, et al. Acute erythroid leukemia: A reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. Blood 2010; 115(10): 1985-92.
12. Zuo Z, Polski JM, Kasyan A, Medeiros LJ. Acute erythroid leukemia. Arch Pathol Lab Med 2010; 134(9): 1261-70.
13. Zeng C, Yu X, Lai J, Yang L, Chen S, Li Y. Overexpression of the long non-coding RNA PVT1 is correlated with leukemic cell proliferation in acute promyelocytic leukemia. J Hematol Oncol 2015; 8: 126.
14. Cui M, You L, Ren X, Zhao W, Liao Q, Zhao Y. Long non-coding RNA PVT1 and cancer. Biochem Biophys Res Commun 2016; 471(1): 10-4.
15. Colombo T, Farina L, Macino G, Paci P. PVT1: A rising star among oncogenic long noncoding RNAs. Biomed Res Int 2015; 2015: 1-10.
16. Liu T, Yu T, Hu H, He K. Knockdown of the long non-coding RNA HOTTIP inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration and induces apoptosis by targeting SGK1. Biomed Pharmacother 2018; 98: 286-96.
17. Ren K, Xu R, Huang J, Zhao J, Shi W. Knockdown of long non-coding RNA KCNQ1OT1 depressed chemoresistance to paclitaxel in lung adenocarcinoma. Cancer Chemother Pharmacol 2017;

80(2): 243-50.
18. Barata P, Sood AK, Hong DS. RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions. Cancer Treat Rev 2016; 50: 35-47.
19. Lai J, Ozen A, Mouritzen P, Tolstrup N, Frandsen NM. Abstract PR14: Potent knock down of lncRNAs in vitro and in vivo with antisense LNA□□ GapmeRs. Cancer Res 2016; 76(6 Suppl): R14.
20. Alvarez-Dominguez JR, Hu W, Gromatzky AA, Lodish HF. Long noncoding RNAs during normal and malignant hematopoiesis. Int J Hematol 2014; 99(5): 531-41.
21. Rodriguez-Malave NI, Rao DS. Long noncoding RNAs in hematopoietic malignancies. Brief Funct Genomics 2016; 15(3): 227-38.
22. Guan Y, Kuo WL, Stilwell JL, Takano H, Lapuk AV, Fridlyand J, et al. Amplification of PVT1 contributes to the pathophysiology of ovarian and breast cancer. Clin Cancer Res 2007; 13(19): 5745-55.
23. Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Uchi R, Matsumura T, Ueo H, et al. Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via apoptosis inhibition in colorectal cancers. Br J Cancer 2014; 110(1): 164-71.
24. Iden M, Fye S, Li K, Chowdhury T, Ramchandran R, Rader JS. The lncRNA PVT1 contributes to the cervical cancer phenotype and associates with poor patient prognosis. PLoS One 2016; 11(5): e0156274.
25. Wang F, Yuan JH, Wang SB, Yang F, Yuan SX, Ye C, et al. Oncofetal long noncoding RNA PVT1 promotes proliferation and stem cell-like property of hepatocellular carcinoma cells by stabilizing NOP2. Hepatology 2014; 60(4): 1278-90.
26. Guo K, Yao J, Yu Q, Li Z, Huang H, Cheng J, et al. The expression pattern of long non-coding RNA PVT1 in tumor tissues and in extracellular vesicles of colorectal cancer correlates with cancer progression. Tumour Biol 2017; 39(4): 1010428317699122.
27. Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. Nucleic Acids Res 2005; 33(1): 439-47.
28. Parasramka MA, Maji S, Matsuda A, Yan IK, Patel T. Long non-coding RNAs as novel targets for therapy in hepatocellular carcinoma. Pharmacol Ther 2016; 161: 67-78.

DOI: *10.22122/jims.v36i477.9946* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 477, 1st Week, July 2018**

Received: 17.04.2018 Accepted: 29.05.2018 Published: 22.06.2018

The Effect of Long Non-Coding RNA PVT1 Inhibition by Antisense LNA GapmeRs Technology on Proliferation of Human Acute Erythroleukemia Cells

Mahsa Salehi[1], Mohammadreza Sharifi[2]

Original Article

Abstract

Background: Long non-coding RNAs (LncRNAs) are a class of RNA molecules with 200-10000 nucleotides in length that have lost their protein coding capacity. They play important role in numerous biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, and cancer development. Acute myeloid leukemia (AML) is the most common leukemia. Evidence has shown that long non-coding RNAs PVT1 is upregulated in acute myeloid leukemia, and leads to an increase in cell proliferation. This study aimed to assess the effect of long non-coding RNA PVT1 inhibition by antisense LNA GapmeRs technology on proliferation of human acute erythroleukemia cells.

Methods: Human acute erythroleukemia cells (KG1), known as subgroup six of acute myeloid leukemia based on the French–American–British (FAB) classification, were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium. Long non-coding RNA PVT1 degradation was performed using antisense LNA GapmeRs technology. At different time points after transfection (24, 48, and 72 hours), long non-coding RNA PVT1 expression and cell proliferation were assessed. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was accomplished to evaluate the long non-coding RNAPVT1 expression. Moreover, Cell viability was measured using 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay.

Findings: Long non-coding RNA PVT1 expression decreased at 24, 48, and 72 hours after transfection in the antisense LNA GapmeRs group compared to control groups. Cell viability and proliferation was significantly decreased in antisense LNA GapmeRs transfected group compared with other two groups.

Conclusion: The present survey exhibited that inhibition of long non-coding PVT1 by using antisense LNA GapmeRs can dramatically reduce the proliferation of human acute erythroleukemia cells. Our results can be helpful in translational medicine for antisense therapy in acute myeloid leukemia.

Keywords: Cell proliferation, Long non-coding RNA, lncRNA PVT1, Acute myeloid leukemia, Erythroleukemia

Citation: Salehi M, Sharifi M. **The Effect of Long Non-Coding RNA PVT1 Inhibition by Antisense LNA GapmeRs Technology on Proliferation of Human Acute Erythroleukemia Cells.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(477): 439-45.

1- MSc Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammadreza Sharifi, Email: mo_sharifi@med.mui.ac.ir