مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۲۹/هفته‌ی اول تیر ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۴

بررسی اثر داروی رزوراترول بر تغییر بیان MicroRNA34a در رده‌ی سلول‌های سرطانی U87MG

نرجس شاهسونی[۱]، مهتا مظاهری[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گلیوبلاستومای چند شکل، به عنوان یکی از رایج‌ترین و تهاجمی‌ترین تومورهای سیستم عصبی مرکزی شناخته شده است. در کنار روش‌های درمانی موجود، استفاده از عوامل اپی‌ژنتیک و به ویژه بررسی تغییر بیان MicroRNAها جهت پیش‌بینی نرخ نجات و نیز گسترش انواع گوناگونی از سرطان‌ها مؤثر واقع شده است. در این مطالعه، اثر داروی رزوراترول بر تغییر بیان MicroRNA34a و Snail در رده‌ی سلولی U87MG (ATCC® HTB-14™) مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی از رده‌ی سلولی U87MG در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین استفاده شد. از داروی رزوراترول با غلظت‌های مختلف جهت بررسی اثر غلظت مهار کنندگی ۵۰ درصد رشد سلول‌ها با روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده گردید. میزان تغییرات MicroRNA و بیان ژن Snail با استفاده از روش کمیت‌سنجی در زمان واقعی (qRT-PCR یا Qualitative real-time polymerase chain reaction) انجام شد. روش ΔΔCT برای آنالیز داده‌های حاصل از بیان ژن استفاده شد.

یافته‌ها: ارزیابی اثر مهار کنندگی داروی رزوراترول در غلظت‌های مختلف به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت نشان داد که غلظت ۴۳/۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر قادر به مهار رشد ۵۰ درصد از سلول‌های تیمار شده بود. آنالیز بیان ژن نیز نشان داد که میزان سطح MicroRNA34a در سلول‌های تیمار شده کاهش و بیان ژن Snail به مقدار قابل توجهی نسبت به سلول‌های شاهد افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: داروی رزوراترول توانایی افزایش بیان microRNA34a را دارد، اما سبب کاهش بیان Snail نمی‌شود و در نتیجه، اثر مثبتی بر کنترل مسیر متاستاز نخواهد داشت.

واژگان کلیدی: گلیوبلاستوما، Real-time polymerase chain reaction، MicroRNA

ارجاع: شاهسونی نرجس، مظاهری مهتا. **بررسی اثر داروی رزوراترول بر تغییر بیان MicroRNA34a در رده‌ی سلول‌های سرطانی U87MG.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۲۹): ۵۳۰-۵۲۵

مقدمه

گلیوبلاستومای چند شکل، از رایج‌ترین انواع تومورهای سیستم عصبی مرکزی است که از سلول‌های ستاره‌ای شکل بافت گلیال منشأ می‌گیرد (۱). این نوع تومور، دارای درجات متفاوتی از چند شکلی است و به عنوان یکی از تهاجمی‌ترین انواع تومورها محسوب می‌شود. هر چند پیشرفت‌های عمده‌ای در زمینه‌ی تشخیص این سرطان در حوزه‌ی پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و جراحی وجود دارد، اما پیش‌آگهی چندان مناسبی برای بیماران مبتلا به گلیومای بدخیم وجود ندارد (۲). علاوه بر نقش عوامل محیطی مانند آسیب مکانیکی و پرتوهای الکترومغناطیسی در بروز این سرطان، اختلال در مسیرهای تحت سلولی بسیاری مانند مسیر RAS/PI3K و PI3K/PTYEN/AKT/mTOR در بروز این سرطان مؤثر می‌باشند (۳). MicroRNAها از دسته‌ی RNAهای کوچک کد کننده با طول حدود ۲۵-۱۸ نوکلئوتید می‌باشند که عملکرد خود را در مرحله‌ی پس از رونویسی اعمال می‌کنند. این MicroRNAها با اتصال به بخش ۳ ترجمه نشدنی از Messenger RNA (mRNA) هدف، سبب تخریب و ممانعت از ترجمه‌ی آن می‌شوند (۴). اختلال و تغییر در بیان MicroRNAها در تمامی سرطان‌ها از جمله گلیوبلاستوما، قابل

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مهتا مظاهری
Email: m.mazaheri@ssu.ac.ir

ردیابی و بررسی می‌باشد؛ به طوری که الگوی بیانی برخی از آن‌ها می‌تواند به عنوان عاملی جهت ردیابی سریع سرطان‌ها مورد استفاده قرار بگیرد (۵). MicroRNA34a به عنوان یکی از عمده‌ترین MicroRNAهای تغییر بیان یافته در انواع سرطان‌ها از جمله گلیوبلاستوما، سرطان کلون و ریه مطرح می‌باشد (۷-۶).

مطالعات تجربی و آزمایشگاهی حاکی از این است که ژن Snail یکی از اهداف مستقیم MicroRNA34a و یکی از اجزای اصلی مسیر Epithelial-mesenchymal transition (EMT) می‌باشد (۸). به علاوه، مطالعات اخیر نشان دهنده‌ی این واقعیت است که القای کاهش بیان در ژن Snail می‌تواند سبب کاهش تهاجم و متاستاز در سلول‌های گلیومایی شود (۱۰-۹).

به تازگی، نقش مؤثر تغذیه و ریز مغذی‌ها و همچنین، تأثیر آن‌ها بر سایر جنبه‌ها غیر از توالی DNA مطرح شده است و به عنوان پدیده‌ای تازه در کنترل فرایندهای مولکولی مطرح می‌باشد (۱۱). در این میان، رزوراترول که جزء ترکیبات طبیعی پلی‌فنولیک است و به میزان زیادی در انگور قرمز یافت می‌شود، دارای اثرات ضد التهابی و ضد رگ‌زایی و همچنین، در فرایندهایی نظیر جلوگیری از تمایز و القای مرگ سلولی مؤثر می‌باشد. این ترکیب، تحت عنوان انواعی از اپی‌داروها مطرح است که تأثیر آن بر بیان ژن‌های مختلف در گستره‌ی وسیعی از رده‌های سلولی به اثبات رسیده است و انتظار می‌رود این ترکیب طبیعی، با تأثیر بر مواردی همچون تغییر در میزان گروه‌های حاضر در زنجیره‌ی جانبی DNA نظیر متیل و استیل که تحت عنوان خاصیت مهار کنندگی هیستون داستیلازی و مهار کنندگی DNA متیل ترانسفراز شناخته می‌شود، بیان ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۱۲).

در این مطالعه، اثر داروی رزوراترول به عنوان عامل مؤثری در مهار متاستاز بر تغییر بیان MicroRNA34a و ژن Snail که دارای بیان بسیار بالایی در سلول‌های گلیوبلاستومای درجه‌ی IV در سلول‌های شیمریک رده‌ی سلولی U87MG است، مورد بررسی و توانایی مهار عوامل اصلی متاستاز از طریق اعمال اثر اپی‌ژنتیکی و تأثیر بر بیان ژن در این رده‌ی سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها

کشت سلولی: رده‌ی سلولی U87MG از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و سلول‌ها در محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glutamax-Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) (Gibco, USA) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین در انکوباتور حاوی ۵ درصد کربن دی‌اکسید (CO_2 یا Carbon dioxide) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد و محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک بار با محیط تازه جایگزین گردید. سلول‌ها به تعداد ۱۰۴ × ۲ عدد در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت DMEM جهت تیمار دارویی کاشته شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها با محیط حاوی ۳ درصد FBS به علاوه‌ی داروی رزوراترول (Trans-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) با غلظت ۴۸/۲۳ میکروگرم/میلی‌لیتر جایگزین و بار دیگر به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. تیمار سلول‌ها به صورت سه بار تکرار بود و به علاوه، Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, USA) در غلظت ۱۲۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه و به عنوان شاهد استفاده شد.

تعیین درصد بقای سلول‌ها توسط MTT assay: جهت تعیین درصد بقای سلول‌ها و یافتن غلظت مناسب تأثیر دارو، از روش 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده شد. به تعداد ۱۰۴ × ۲ سلول شمارش شد و در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، جهت اتصال سلول‌ها به کف چاهک، غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از دارو، به مدت ۴۸ ساعت بر روی سلول‌ها اثر داده شد. پس از انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر به هر چاهک افزوده گردید. هر غلظت، به صورت سه بار تکرار شد و از DMSO با رقت ۴۰۰/۱ به عنوان شاهد استفاده گردید. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت تخلیه شده و ۲۰۰ میکرولیتر حلال MTT حاوی DMSO به هر چاهک افزوده شد تا کریستال‌های فورمازان حل شود و میزان بقای سلول‌ها در این بازه‌ی زمانی مشخص گردد. میزان جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش و نسبت بقای هر چاهک در مقایسه با حالت شاهد سنجیده شد.

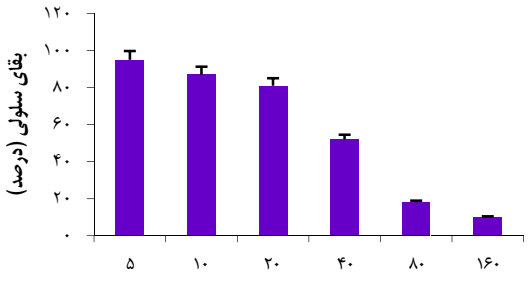
آنالیز بیان ژن با روش Quality realtime-polymerase chain reaction (qRT-PCR): از سلول‌های تیمار شده با غلظت دارویی مناسب و همچنین، DMSO به عنوان تیمار شاهد جهت استخراج مولکول‌های RNA با استفاده از کیت تجاری TRIzol (Invitrogene,USA) استفاده شد. بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش qRT-PCR با استفاده از دستگاه Light syclere (Applied Bio system, USA)انجام شد. محلول واکنش شامل ۲ میکرو لیتر (۵۰ نانوگرم) Complementary DNA (cDNA)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومولار)، ۱۰ میکرو لیتر Hot Tag EvaGreen (Biotium, USA) و حجم محلول واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر عاری از آنزیم RNase به

۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. از توالی آغازگرهای (F:5'-ACCACTATGCCGCGCTCTT-3'; R:5'-TCGTAGGGCTGCTGGAA-3') و SnailSu6 (F:5'-CGTCATCAAACCGTTACCATTAC-3 ; R :5'-AAAGGTTGTTCTCCACTCTCTCTC-3') برای miR34a بررسی بیان ژن استفاده شد. از ژن مرجع GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به منظور طبیعی‌سازی داده‌ها استفاده شد.

آنالیز داده‌ها: تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. در متغیرهایی که از توزیع طبیعی برخوردار بودند، از روش t و ANOVA و در متغیرهایی که دارای توزیع طبیعی نبودند، از Mann-Whitney استفاده شد. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن در زمان واقعی، با استفاده از طبیعی‌سازی داده‌های تیمار و شاهد با ژن مرجع و روش ΔΔCT با نرم‌افزار Excel نسخه‌ی ۲۰۰۷ انجام گردید (۱۳).

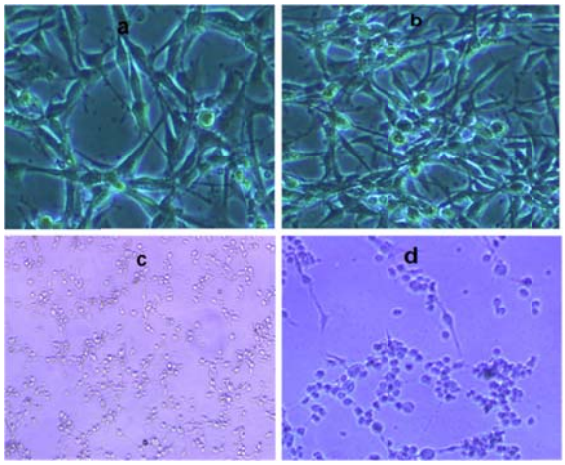
یافته‌ها

بقا: کاربرد دزهای مختلف دارو جهت تعیین بقای سلول‌ها نشان داد که در میان غلظت‌های مورد استفاده، غلظت ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از دارو بیشترین اثر کشندگی (۹۸ درصد) و غلظت ۱۶۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کمترین اثر (۵ درصد) را داشت. غلظت ۴۸/۲۳ میکروگرم/میلی‌لیتر از داروی رزوراترول، قادر به از بین بردن ۵۰ درصد از سلول‌های تحت تیمار بود (شکل ۱).



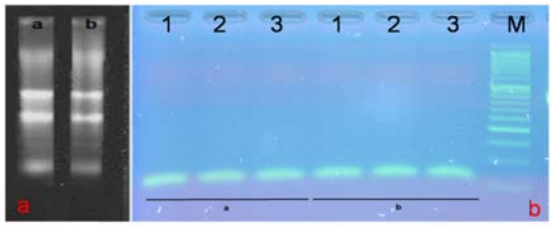
شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف رزوراترول بر روی بقای رده‌ی سلول‌های سرطانی U87MG

با توجه به محاسبات انجام شده و نوع دارو، استدلال شد که عملکرد این دارو تحت تأثیر زمان قرار ندارد و اثرگذاری دارو، وابسته به غلظت آن می‌باشد. همچنین، یافته‌ها نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، میزان بقای سلول‌ها به شدت کاهش و درصد آپوپتوز سلول‌ها به شدت افزایش می‌یابد (شکل ۲، a-c).



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف دارو بر ریخت‌شناسی سلول‌ها. a: اثر غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از دارو بر سلول‌ها، b: اثر غلظت ۴۸/۲۳ میکروگرم/میلی‌لیتر (Half maximal inhibitory concentration یا IC50) بر سلول‌ها. c و d: به ترتیب میزان اثر غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از دارو بر سلول‌ها و مشاهده‌ی افزایش میزان آپوپتوز سلولی در غلظت‌های بسیار بالای رزوراترول

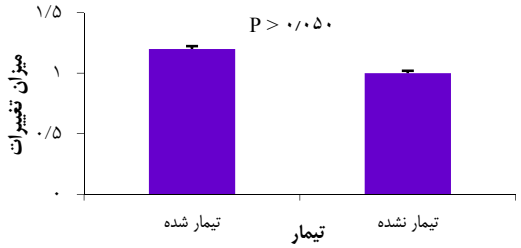
آنالیز بیان ژن: استخراج مولکول‌های RNA از سلول‌های تحت تیمار و شاهد و سنتز رشته‌ی اول و به دنبال آن تهیه‌ی مولکول‌های cDNA با استفاده از کیت‌های تجاری انجام و کیفیت‌سنجی مولکول‌های استحصال شده نشان داد که کیفیت مناسب بدون هیچ شکستگی در مولکول‌های mRNA و همچنین، عدم آلودگی با مولکول‌های DNA حاصل شده است (شکل ۳-a). سنتز مولکول‌های cDNA با استفاده از آغازگرهای تصادفی در دو مرحله و بررسی مولکول‌های حاصل نشان داد که این مولکول‌ها به درستی ساخته شده‌اند و فاقد هر گونه شکستگی و دایمر می‌باشند.



شکل ۳. استخراج مولکول‌های Messenger RNA (mRNA) از سلول‌های تیمار شده با دارو، مورد استفاده در سنتز complementary DNA (cDNA) (a) مولکول‌های MicroRNA34a و (b) سنتز مولکول‌های مربوط به ژن Snail (M: نشانگر ۵۰ bp).

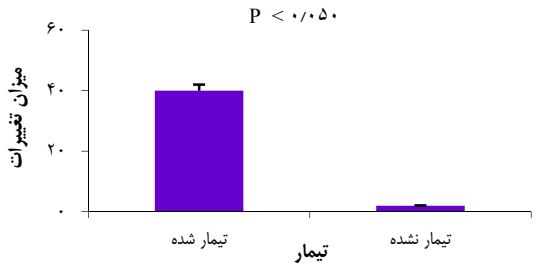
جهت ارزیابی کارایی آغازگرها و تعیین دمای ذوب آن‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مولکول‌های cDNA و دماهای گرادیان انجام و مناسب‌ترین دما برای جفت ژن انتخاب گردید. بهترین دمای ذوب برای ژن MicroRNA34a دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای ژن Snail دمای ۸۱/۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین گردید و در برنامه‌ی دمایی، بیان ژن در زمان واقعی مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی میزان بازدهی واکنش، منحنی استاندارد رسم گردید.

تأثیر دارو بر بیان MicroRNA34a و ژن Snail. بررسی اثر داروی رزوراترول بر بیان MicroRNA34a در سلول‌های U87MG در سطح mRNA نشان داد که سطح بیان نسبی MicroRNA34a در مقایسه با گروه شاهد به میزان اندک افزایش می‌یابد، اما از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P > ۰/۰۵۰$) (شکل ۴).



شکل ۴. میزان تغییرات بیان MicroRNA34a در سلول‌های سرطانی U87MG تیمار شده با رزوراترول به مدت ۴۸ ساعت

بررسی بیان ژن Snail در سلول‌های تیمار یافته، افزایش چشم‌گیری از بیان Snail را در مقایسه با گروه شاهد تیمار شده با DMSO نشان داد ($P < ۰/۰۵۰$) (شکل ۵).



شکل ۵. میزان تغییرات بیان Snail در سلول‌های سرطانی U87MG تیمار شده با رزوراترول به مدت ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه شاهد تیمار شده با Dimethyl sulfoxide (DMSO)

بحث

با توجه به وضعیت سرطان گلیوبلاستوما که درجه‌ی چهارم آستروسیتوما با تعداد بسیار زیاد سلول‌های متاستاز یافته می‌باشد، سرکوب مسیرهای دخیل در تهاجم و متاستاز سلولی جهت افزایش نرخ نجات از این بیماری مفید فایده خواهد بود (۱۴). MicroRNA34a به عنوان یکی از سرکوبگرهای تومور شناخته شده است که در تعداد زیادی از سرطان‌ها از جمله گلیوبلاستوما دچار کاهش بیان می‌شود (۱۶-۱۵، ۶). ژن Snail از اهداف مستقیم این ریزRNA و به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل مسیر EMT محسوب می‌شود. EMT، به عنوان مسیری است که در آن به سبب فقدان و از دست رفتن میان‌کنش‌های بین سلولی، زمینه‌ی ایجاد تهاجم و متاستاز فراهم می‌گردد (۱۷). این مسیر، به عنوان یکی از اساسی‌ترین مسیرهای مؤثر در تهاجم سلولی در سرطان معده (۱۸) و سرطان تخمدان محسوب می‌شود (۱۹)، اما مطالعات اندکی در رابطه با میزان نقش آن در گلیوبلاستوما انجام شده است. بر اساس استفاده‌ی گسترده از ترکیبات گیاهی به دلیل تأثیرات منفی اندک آن‌ها و نیز قابلیت کنترل گسترده‌ی عملکرد آن‌ها، از این ترکیبات در جهت درمان بیماری‌های مختلف و به خصوص در پیش‌گیری و بهبود انواع سرطان‌ها استفاده می‌شود. رزوراترول، به عنوان یکی از ترکیبات پلی‌فنولیک که به میزان فراوان در انگور قرمز یافت می‌شود، دارای اثرات ضد سرطانی گوناگونی با به کارگیری مسیرهای مولکولی متعدد می‌باشد (۱۲).

بر اساس مطالعات انجام شده، رزوراترول توانایی القای مرگ سلولی در سلول‌های U87MG به ویژه در غلظت‌های بالا را دارد. به منظور بررسی تأثیر این ماده بر مسیر EMT، تغییرات بیان MicroRNA34a و ژن هدف آن Snail مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که رزوراترول، توانایی کاهش بیان نسبی Snail را در سطح رونویسی در سلول‌های U87MG ندارد و در نتیجه، توانایی کاهش تهاجم و متاستاز سلولی را نیز نخواهد داشت. مطالعات اخیر، حاکی از تأثیر مثبت این دارو در سرکوب تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطان معده با به کارگیری مسیرهای Hedgehog و EMT می‌باشند (۲۰).

به علاوه، مشاهده شده است که رزوراترول، توانایی مهار مسیر EMT در سلول‌های سرطان تخمدان به وسیله‌ی کاهش میزان بیان Snail را دارد. در مطالعه‌ی دیگری، ثابت شده است که رزوراترول، توانایی مهار مسیر EMT در سرطان کلورکتال به وسیله‌ی کاهش سطح بیان Snail و E-cadherin در مسیر Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) (۲۱) و همچنین، مسیر Wnt/β–Catenin را دارد (۲۲).

بر مبنای مطالعات قبلی انجام شده، رزوراترول از دسته ترکیبات دارای خاصیت DNA methyltransferase inhibitor (DNMTi) می‌باشد که توانایی افزایش بیان ژن‌های سرکوب را دارد (۱۲). این مطالعات اشاره دارند که رزوراترول، بیان MicroRNAهای سرکوب شده و مربوط به آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه را افزایش می‌دهد (۲۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که سطح بیان MicroRNA34a با

درجه‌ی گلیوما در ارتباط است و پیش‌آگهی در افراد دارای درجه‌ی بالای گلیوما و همچنین، سطوح پایین MicroRNA34a بسیار اندک می‌باشد (۲۰). همچنین، اثبات شده است که افزایش بیان MicroRNA34a می‌تواند بر تمایز، تهاجم و مرگ سلولی در رده‌های سلولی گلیوبلاستوما مؤثر باشد (۵).

در این مطالعه، رزوراترول سبب افزایش اندک بیان MicroRNA34a در رده‌ی سلولی U87MG شده است که می‌تواند ناشی از اثر DNMTi این ترکیب باشد. مطالعات گسترده‌ی بیشتری جهت بررسی این دارو بر میزان متیلاسیون پروموتر ژن MicroRNA34a در قبل و بعد از تیمار دارویی مورد نیاز می‌باشد.

افزایش اندک بیان ژن توسط این دارو، نشانگر این واقعیت است که دارو باید به همراه سایر ترکیبات با اثر بیشتر بر بیان ژن و یا به صورت ترکیبی به کمک سایر روش‌های تهاجمی جهت اثربخشی بیشتر مورد استفاده قرار بگیرد. در غیر این صورت، به دلیل قدرت تهاجم بالای این سلول‌ها، این ترکیب اثر چندانی جهت تغییر در بیان نخواهد داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله، بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک به شماره‌ی ۹۳/۱۲۳ می‌باشد که در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تصویب و انجام گردید.

References

1. Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(12): 6242-4.
2. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. Nat Clin Pract Neurol 2006; 2(9): 494-503.
3. Dimov I, Tasic D, Stefanovic I, Dimov D. New insights into molecular basis of glioblastoma multiforme and associated immunosuppression. Acta Fac Med Naiss 2013; 30(4): 165-84.
4. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol 2007; 302(1): 1-12.
5. Henriksen M, Johnsen KB, Andersen HH, Pilgaard L, Duroux M. MicroRNA expression signatures determine prognosis and survival in glioblastoma multiforme--a systematic overview. Mol Neurobiol 2014; 50(3): 896-913.
6. Li XJ, Ren ZJ, Tang JH. MicroRNA-34a: A potential therapeutic target in human cancer. Cell Death Dis 2014; 5: e1327.
7. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? Mol Ther Nucleic Acids 2014; 3: e194.
8. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: Role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. Oncogene 2005; 24(50): 7443-54.
9. Myung JK, Choi SA, Kim SK, Wang KC, Park SH. Snail plays an oncogenic role in glioblastoma by promoting epithelial mesenchymal transition. Int J Clin Exp Pathol 2014; 7(5): 1977-87.
10. Savary K, Caglayan D, Caja L, Tzavlaki K, Bin NS, Bergstrom T, et al. Snail depletes the tumorigenic potential of glioblastoma. Oncogene 2013; 32(47): 5409-20.
11. Shukla S, Meeran SM, Katiyar SK. Epigenetic regulation by selected dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. Cancer Lett 2014; 355(1): 9-17.
12. Thakur VS, Deb G, Babcook MA, Gupta S. Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. AAPS J 2014; 16(1): 151-63.
13. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29(9): e45.
14. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. Genes Dev 2012; 26(8): 756-84.
15. Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, et al. MicroRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. Cell Cycle 2010; 9(6): 1031-6.
16. Yu X, Zhang W, Ning Q, Luo X. MicroRNA-34a inhibits human brain glioma cell growth by down-regulation of Notch1. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2012; 32(3): 370-4.
17. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest 2009; 119(6): 1420-8.
18. Huang L, Wu RL, Xu AM. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. Am J Transl Res 2015; 7(11): 2141-58.
19. Davidowitz RA, Selfors LM, Iwanicki MP, Elias KM, Karst A, Piao H, et al. Mesenchymal gene program-expressing ovarian cancer spheroids exhibit enhanced mesothelial clearance. J Clin Invest 2014; 124(6): 2611-25.
20. Gao H, Zhao H, Xiang W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. J Neurooncol 2013; 113(2): 221-8.
21. Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, et al. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF-beta1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. BMC Cancer 2015; 15: 97.
22. Ji Q, Liu X, Fu X, Zhang L, Sui H, Zhou L, et al. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/beta-catenin signal pathway. PLoS One 2013; 8(11): e78700.
23. Venkatadri R, Muni T, Iyer AK, Yakisich JS, Azad N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. Cell Death Dis 2016; 7: e2104.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 25.10.12016
Vol. 35, No. 429, 1st Week, July 2017
Accepted: 24.12.2016

The Effect of Resveratrol on Expression of microRNA34a in U87MG Cancerous Cells Line

Narjes Shahsavani[1], Mahta Mazaheri[2]

Original Article

Abstract

Background: Glioblastoma multiform (GBM) is known as the most current and invasive kind of central nervous system tumors. In addition to existing therapy methods, using epigenetic factors specially investigation of microRNAs expression level has been known to predict prognosis, survival rate, and prevalence of a variety of cancers. In this study, the effect of resveratrol on expression level of miRNA34a and Snail gene in U87MG (ATCC® HTB-14™) cell line was investigated.

Methods: In this experimental research, U87MG (ATCC® HTB-14™) cell was used in culture medium content of 1% fetal bovine serum (FBS) with penicillin and streptomycin antibiotics. Resveratrol at different concentrations was used to determine 50% inhibitory effect on cell growth in cultured cells using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) method. Changes in microRNA and Snail gene expression were assessed using qualitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. ΔΔCT method was used to analyze gene expression data.

Findings: Assessing inhibitory effect of resveratrol at different concentration for 48 hours in culture medium showed that the concentration of 43.23 µg/ml was able to inhibit growth of 50% of treated cells. Gene expression analysis indicated that expression level of microRNA34a decreased while Snail gene expression significantly increased compared to control cells.

Conclusion: Resveratrol has ability to increase expression of microRNA34a but this increase did not resulted to decrease of Snail gene expression. So, it has not positive effect to control of metastasis pathway.

Keywords: Glioblastoma, Real-time polymerase chain reaction, MicroRNA

Citation: Shahsavani N, Mazaheri M. **The Effect of Resveratrol on Expression of microRNA34a in U87MG Cancerous Cells Line.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(429): 525-30.

1- MSc Student, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Corresponding Author: Mahta Mazaheri, Email: m.mazaheri@ssu.ac.ir