DOI: 10.22122/jims.v39i635.14114 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۳۵/هفته‌ی سوم مهر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۱۱ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۷/۲۱

اثر محافظتی و درمانی DNA واکسن حاصل از قطعات ایمنی‌زای آنتی‌ژن BORIS بر سرطان کولون در موش‌های Balb/c

الهام مهدور[۱]، فاطمه قهرمانی[۲]، آمنه جاوید[۳]، سید حسین حجازی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ایمونوتراپی، امروزه به عنوان یک روش نوین در پیش‌گیری و درمان سرطان در حال گسترش است. گروهی از آنتی‌ژن‌ها که در ایمونوتراپی استفاده می‌شوند، آنتی‌ژن‌های سرطانی بیضه‌ای هستند. در این مطالعه، از آنتی‌ژن Brother of regulator of imprinted sites (BORIS) که یک آنتی‌ژن سرطانی بیضه‌ای است، جهت طراحی DNA واکسن با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک استفاده شد و علیه سرطان کولون در موش‌های Balb/c ارزیابی گردید.

روش‌ها: در مطالعه‌ی قبلی، مناطق غالب ایمنی از آنتی‌ژن BORIS شناسایی شد و پس از اصلاحات مناسب و ترجمه‌ی معکوس در پلاسمید pcDNA3.1 به عنوان DNA واکسن قرار گرفت و موش‌های Balb/c چهار نوبت توسط آن ایمن شدند. ۱۴ روز پس از آخرین تزریق، میزان سیتوکین‌ها و آنتی‌بادی‌های اختصاصی اندازه‌گیری شد. همچنین، جهت بررسی اثر حفاظتی DNA واکسن، موش‌ها با تزریق سلول‌های رده‌ی سرطانی کولون (CT26) مبتلا به تومور شدند و رشد تومورها به مدت ۲۸ روز بررسی گردید.

یافته‌ها: واکسیناسیون با مولتی اپی‌توپ DNA واکسن، موجب افزایش میزان سیتوکین‌های Interferon gamma (IFN-γ)، Interleukin 4 (IL-4) ($P < ۰/۰۰۱$) و آنتی‌بادی‌های اختصاصی Immunoglobulin G1 (IgG1)، IgG2a، IgG Total ($P < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه‌های شاهد (Phosphate buffered saline یا PBS و pcDNA3.1-VAC) گردید. همچنین، حجم تومورها به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه‌های شاهد کاهش داشت.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، به کارگیری مولتی اپی‌توپ DNA واکسن حاصل از آنتی‌ژن BORIS در مدل موش مبتلا به تومور، می‌تواند به عنوان راهکاری برای القای پاسخ ایمنی ضد تومور و کاهش رشد تومور گردد.

واژگان کلیدی: ایمونوتراپی؛ DNA واکسن؛ سرطان کولون؛ پلاسمید؛ موش Balb/c

ارجاع: مهدور الهام، قهرمانی فاطمه، جاوید آمنه، حجازی سید حسین. **اثر محافظتی و درمانی DNA واکسن حاصل از قطعات ایمنی‌زای آنتی‌ژن BORIS بر سرطان کولون در موش‌های Balb/c.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۳۵): ۵۷۱-۵۶۴.

مقدمه

ایمونوتراپی، یکی از روش‌های نوین در درمان انواع سرطان‌ها می‌باشد. ایمونوتراپی، با تحریک سیستم ایمنی موجب فعال نمودن اختصاصی سیستم ایمنی علیه سلول‌های تغییر یافته می‌شود که این امر، در نهایت منجر به شناسایی و حذف سلول‌های مبتلا به تومور به وسیله‌ی سیستم ایمنی فرد می‌گردد. ایمونوتراپی، نسبت به دیگر روش‌های درمان سرطان نظیر پرتودرمانی یا شیمی درمانی عوارض جانبی بسیار کمتری دارد (۱). یکی از روش‌های نوین ایمونوتراپی، استفاده از واکسن‌های ژنتیکی است که شامل DNA واکسن و RNA واکسن است (۲).

در حال حاضر، یکی از انواع RNA واکسن‌ها که مورد تأیید Food and Drug Administration (FDA) امریکا می‌باشد و به طور گسترده استفاده می‌شود، واکسن Tozinameran است که جهت مقابله با عفونت SARS-CoV-2 و پیش‌گیری از ابتلا به بیماری کرونا استفاده می‌گردد (۳). به طور کلی، در اثر تزریق عضلانی ژنتیک واکسن‌ها، پلاسمید هدف به داخل سلول می‌رود و از امکانات سلول نظیر RNA پلیمراز جهت تولید پروتئین بهره می‌گیرد و محصول

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی فنی و مهندسی، دانشگاه علم و هنر یزد، یزد، ایران

۲- استادیار، گروه تکنولوژی پرتودرمانی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی فنی و مهندسی، دانشگاه علم و هنر یزد، یزد، ایران

۴- استاد، مرکز تحقیقات پوست و سالک و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: استاد، مرکز تحقیقات پوست و سالک و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: hejazi@med.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

پروتئینی بر سطح سلول عرضه می‌گردد که باعث ایجاد پاسخ ایمنی نسبت به سلول‌های ارایه کننده‌ی این آنتی‌ژن‌ها می‌گردد (۴). با شناسایی اولیه‌ی آنتی‌ژن روی سطح سلول‌ها، Tcellها فعال می‌شوند و پس از برخورد مجدد با آنتی‌ژن‌های عرضه شده روی Antigen-presenting cells (APCs)، Tcellها پاسخ‌های قوی‌تر و طولانی‌تری ایجاد می‌کنند که باعث ایجاد ایمنی خاطره‌ای می‌گردد (۵).

با کسب ایمنی خاطره‌ای توسط سیستم ایمنی، در صورت برخورد با بافت‌ها و سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن، سلول‌های ایمنی با قدرت بالا به آن‌ها حمله می‌کنند و باعث از بین رفتن آن‌ها می‌گردند (۶). امروزه، گروه جدیدی از آنتی‌ژن‌ها با نام آنتی‌ژن‌های سرطانی/بیضه‌ای (Cancer testis antigen یا CTA) در ایمونوتراپی سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). به طور کلی، بیان طبیعی این آنتی‌ژن‌ها محدود به بیضه است و در بافت‌های طبیعی بدن یا بیان ندارند و یا بیانشان بسیار اندک است (۸).

وجود سد خونی- بیضه‌ای در بافت بیضه، باعث گردیده است که سیستم ایمنی این آنتی‌ژن‌ها را بیگانه تلقی کنند و در صورت بیان نابه‌جا در بافت‌های دیگر، مشابه بیان آن‌ها در بافت‌های سرطانی سبب ایجاد پاسخ سیستم ایمنی گردد (۹). به همین جهت، آنتی‌ژن‌های سرطانی/بیضه‌ای، اهداف مناسبی جهت طراحی واکسن‌ها علیه سرطان هستند. اختلال در بیان ژن‌ها سبب بیان آنتی‌ژن‌های سرطانی/بیضه‌ای در تومورهای مختلف می‌گردد. از این رو، ایمن‌سازی با این آنتی‌ژن‌ها، می‌تواند باعث پاسخ سیستم ایمنی به بافت‌های مبتلا به تومور گردد (۱۰).

طی سال‌های گذشته، آنتی‌ژن‌های سرطانی بیضه‌ای، به دلیل عوارض جانبی کمی که دارند، مورد توجه قرار گرفته‌اند و بسیاری از این آنتی‌ژن‌ها نظیر Melanoma antigen family A (MAGE-A) و New York esophageal squamous cell carcinoma (NY-ESO) در مراحل کارآزمایی بالینی قرار دارند (۱۲-۱۱). یکی از انواع CTAها، آنتی‌ژن Brother of regulator of imprinted sites (BORIS) است. BORIS، یک پروتئین متصل شونده به DNA است که به طور طبیعی در بافت بیضه بیان می‌شود و در بافت‌های طبیعی دیگر، بیان بسیار محدود دارد (۱۳).

BORIS، در سرطان‌های پروستات، ملانوما، روده‌ی بزرگ و ریه، دارای بیان بالاتری می‌باشد (۱۴). همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که در افراد مبتلا به سرطان، آنتی‌بادی اختصاصی علیه این آنتی‌ژن وجود دارد که نشان دهنده‌ی عدم تحمل سیستم ایمنی مرکزی نسبت به این آنتی‌ژن است (۱۵). سه ویژگی خاص این آنتی‌ژن که شامل آنتی‌ژنیک بودن، بیان بالا در سرطان‌های مختلف و عدم بیان در بافت طبیعی است، BORIS را به عنوان یک هدف ایده‌آل برای ایمونوتراپی مطرح می‌کند (۱۵). در مطالعه‌ی مهدی‌ور، قطعات ایمونوژن این آنتی‌ژن، به عنوان کاندیدا انتخاب گردید و واکسن با استفاده از محاسبات بیوانفورماتیک طراحی شد، که طبق نتایج واکاوی‌های ایمونوانفورماتیک، این واکسن توانایی فعال‌سازی هر دو بازوی ایمنی هومورال و سلولی را دارد (۱۶).

این مطالعه، با هدف بررسی پاسخ سیستم ایمنی و اثرات حفاظتی مولتی اپی‌توپ DNA واکسن حاصل از آنتی BORIS که به روش‌های بیوانفورماتیک طراحی گردید، در مدل موشی Balb/c علیه سرطان کولون (رده‌ی CT26) که بیان کننده‌ی آنتی‌ژن BORIS می‌باشد، انجام شد.

روش‌ها

کشت پلاسمید pcDNA3.1 به عنوان DNA واکسن با روش‌های بیوتکنولوژی: در مطالعه‌ی مهدی‌ور، بعد از شناسایی قطعات ایمونوژن آنتی‌ژن BORIS و طراحی DNA واکسن، پلاسمید pcDNA3.1 به عنوان کاست ویروسی حاوی قطعات آنتی‌ژن BORIS طراحی گردید. پلاسمید pcDNA3.1 (pcDNA3.1-VAC) به عنوان DNA واکسن به شرکت GeneCust در کشور لوکزامبورگ سفارش داده شد و پس از دریافت پلاسمید به منظور کلون‌سازی در باکتری Escherichia coli Top10 طبق شیوه‌نامه‌های مستعدسازی، تغییر شکل یافت و کلونینگ انجام گردید. پس از رشد کلنی‌ها و تأیید نوترکیب بودن آن‌ها، پلاسمید pcDNA3.1-VAC توسط کیت استخراج Roche آلمان و طبق دستور کار آن استخراج گردید. پلاسمید استخراج شده در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار کل پلاسمید استخراج شده، توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری گردید.

تأیید بیان pcDNA3.1 در رده‌ی سلول L929: مقدار ۱۰۰ میکروگرم از pcDNA3.1-VAC با استفاده از (Thermo Fisher Scientific) Turbofect، جهت تشخیص عملکرد DNA واکسن در میزبان یوکاریوتی، به سلول‌های L929 منتقل شد. سلول‌های L929 در مرحله‌ی انتقال باید در مرحله‌ی رشد لگاریتمی باشند. سلول‌های L929 با تراکم ۵×۱۰^۵ با استفاده از محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) در پلیت چاهک‌دار ۲۴ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت قبل از انتقال کشت داده شد و ۱/۲ میکروگرم pcDNA3.1-VAC در ۱۰۰ میکرولیتر محیط Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) رقیق شد. پس از آن، محلول ترانسفکت و pcDNA3.1-VAC رقیق شده به آرامی با استفاده از پیپتینگ مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول، به هر چاهک اضافه گردید و پلیت به آرامی تکان داده شد. هشت ساعت پس از ترانسفکشن، پلیت کشت برای ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. در پایان، جهت بررسی و تشخیص پروتئین، روی نمونه‌ها

وسترن بلات (Western blot) انجام شد.

روش Western blot برای شناسایی و تأیید پلی اپی‌توپ: جهت تأیید بیان وکتورهای pcDNA3.1-VAC در میزبان L929 پس از گذشت ۴۸ ساعت از انتقال و بیان پروتئین، سلول میزبان یوکاریوتی تجزیه و پس از الکتروفورز، نمونه‌ی پروتئینی جهت انجام آزمون Western blot به غشای نیتروسلولزی منتقل شد. به علت دنباله‌ی هیستیدینی پپتید، غشا با رقت ۱/۲۰۰۰ از آنتی‌بادی ضد His-tag (آنتی‌بادی ضد دنباله‌ی هیستیدینی کونژوگه با آنزیم Horseradish peroxidase یا HRP) یا متصل به HRPorseradish peroxidase (به عنوان کاتالیزور واکنش اکسید شدن DAB) انکوباسیون شد تا برچسب هیستیدینی شناسایی شود. در این فرایند، از محلول DAB (3,3′-Diaminobenzidine Roche, Germany) استفاده شد که با اکسیده شدن، ایجاد رنگ می‌کند. پس از تأیید با آزمون Western blot، pcDNA3.1-VAC به عنوان DNA واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

ایمن‌سازی موش‌ها: تعداد ۳۰ سر موش ماده‌ی ۶-۴ هفته‌ای نژاد Balb/c از پژوهشگاه رویان اصفهان خریداری گردید و به مدت یک هفته جهت سازگاری با شرایط حیوان خانه، در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و رژیم غذایی مناسب، نگهداری شدند. اصول اخلاقی پژوهش روی حیوانات در تمامی مراحل کار طبق شیوه‌نامه‌ی موجود رعایت گردید. حیوانات به ۳ گروه ده‌تایی تقسیم گردیدند که شامل گروه اول PBS (۱۰۰ میکرولیتر) به عنوان شاهد منفی، گروه دوم pcDNA3.1 (۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر) به عنوان شاهد دوم و گروه سوم pcDNA3.1-VAC (۱۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر) به عنوان DNA گروه واکسن در نظر گرفته شد. تزریق تمامی گروه‌ها به صورت عضلانی در عضله‌ی ران موش ۴ نوبت و با فاصله‌ی زمانی هفت روز انجام گردید.

روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) غیر مستقیم جهت بررسی آنتی‌بادی‌های اختصاصی سرم: دو هفته پس از آخرین تزریق از هر گروه، تعداد ۵ موش خون‌گیری شدند و خون جدا شده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه گردید و سپس، با شتاب ۵۰۰۰ دور/دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم هر گروه، توسط سمپلر جدا و شماره‌گذاری گردید. جهت آماده‌سازی کیت ELISA، در ابتدا پروتئین‌های نوترکیب (پلی‌پپتید واکسن) با غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به کف پلیت کوت شد. پس از ۲۴ ساعت، محلول بلاک کننده‌ی Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Japan) با غلظت ۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر به پلیت اضافه گردید و انکوبه شد. برای انجام آزمایش ELISA، سرم جدا شده از هر گروه از موش‌های واکسینه شده به عنوان آنتی‌بادی اولیه با نسبت ۱:۲۰ رقیق و به پلیت اضافه گردید به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. در ادامه، آنتی‌بادی کونژوگه شده با آنزیم HRP (Sigma, Japan) شامل Ani-IgG total، Anti-IgG1 و Anti–IgG2a به عنوان آنتی‌بادی ثانویه به طور کامل به وسیله‌ی بافر رقیق کننده‌ی آنتی‌بادی مطابق دستورالعمل رقیق‌سازی به پلیت‌ها اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. پس از شست و شو، به علت آن که آنتی‌بادی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز می‌باشد، TMB (Sigma) به عنوان سوبسترا اضافه شد و مجدد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از اسید سولفوریک ۰/۲ مولار به عنوان خاتمه دهنده‌ی واکنش اضافه شد و جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از ELISA reader خوانده شد.

بررسی میزان سیتوکین‌های Interferon gamma (IFN-γ) و Interleukin 4 (IL-4): طحال موش‌های نخاعی شده در شرایط استریل هود بیولوژیک خارج شد. سپس، طحال‌ها در شرایط استریل ابتدا قطعه قطعه و سپس، هموژنیزه شد و با ۲ میلی‌لیتر محیط کامل RPMI 1640 به منظور یکنواخت شدن پیپتاژ شد و با استفاده از سانتریفیوژ، شست و شوگردید و رسوب به دست آمده در مرحله‌ی آخر، دوباره در یک میلی‌لیتر محیط RPMI 1640 سوسپانسیون شد. سپس، رنگ تریپان بلو با نرمال سالین رقیق شد و لنفوسیت‌های حاصل با تریپان بلو به نسبت ۹:۱ رنگ شدند. جهت شمارش سلول های زنده از لام نئوبار استفاده شد. رقیق‌سازی سلول‌ها با محیط RPMI 1640 به گونه‌ای انجام گرفت که در هر میلی‌لیتر محیط، ۲ میلیون سلول به دست آمد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های رقیق شده در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2 به مدت ۵ روز انکوبه شدند. سپس، طبق شیوه‌نامه‌ی کیت ELISA (محدوده‌ی Abcam: ۲۰۰-۶/۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر) با حساسیت ۲/۳۷۴ نانوگرم/میلی‌لیتر پلیت‌های آزمایش آماده‌سازی و توسط دستگاه ELISA، میزان IFN-γ و IL-4 در سوپ سلولی به دست آمده از کشت، اندازه‌گیری شد.

ایجاد مدل مبتلا به تومور سرطان کولون در موش‌های Balb/c

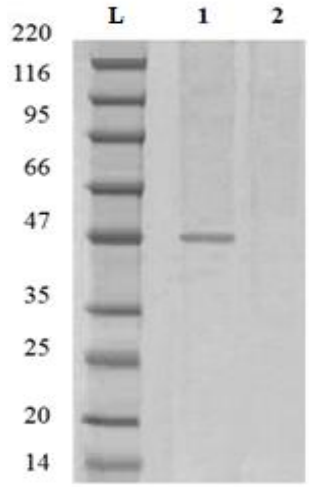
سلول‌های CT26 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران، ایران خریداری شد و برای ایجاد مدل تومور کولون در موش‌های Balb/c مورد استفاده قرار گرفت. دو هفته پس از ایمن‌سازی موش‌ها، سلول‌های تکثیر شده جهت ایجاد تومور به موش‌ها تزریق گردید. سلول‌های CT26 با RPMI 1640 دارای FBS ۱۰ درصد و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با CO_2 معادل ۵ درصد نگهداری شدند. پس از برداشت سلول‌ها و شمارش، تعداد ۵۰۰۰۰۰ سلول رقیق شده با ۱۰۰ میکرولیتر PBS به صورت زیرجلدی در پهلوی راست هر موش تزریق شد. حدود یک هفته بعد از تزریق، تومورها پدیدار شد و

اندازه‌گیری تومورها با استفاده از کولیس هر سه روز یک بار به مدت ۲۸ روز انجام شد و حجم تومور بر اساس فرمول بزرگ‌ترین قطر ضرب در توان دوم کوچک‌ترین قطر محاسبه گردید.

تحلیل آماری: با استفاده از نرم‌افزار JMP 11.0 تجزیه و تحلیل آماری و گراف‌ها انجام شد. تمام داده‌ها از جمله سطوح سرمی آنتی‌بادی و تولید سیتوکین‌ها، با استفاده از آزمون ANOVA مقایسه شد.

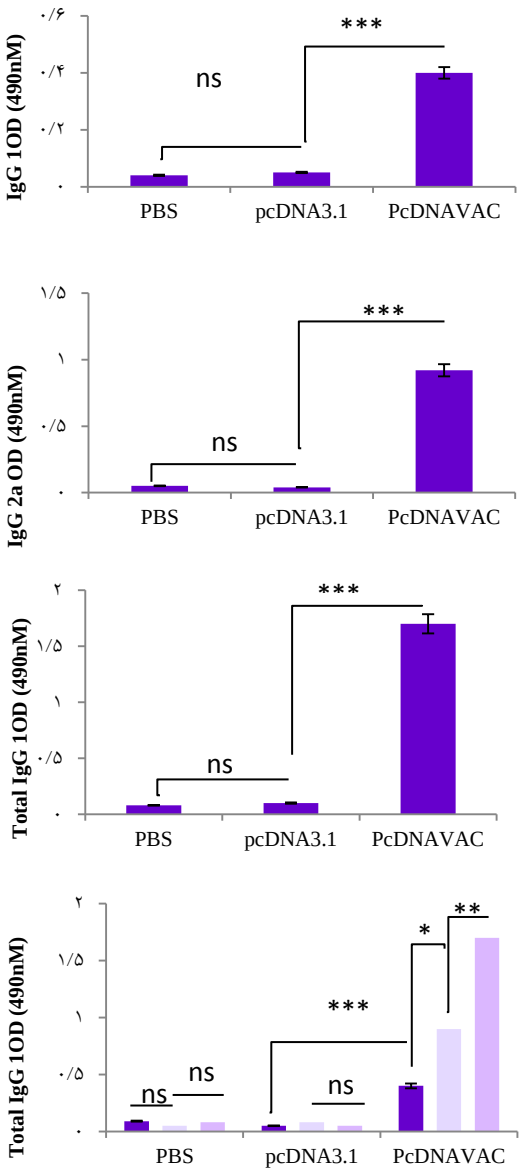
یافته‌ها

روش Western blot جهت شناسایی و تأیید بیان DNA واکسن چند اپی‌توپی: پس از انجام آزمون Western blot با واکاوی و مقایسه‌ی غشای رنگ شده، مشاهده گردید که بعد از القا، تنها پروتئین‌های ردیابی شده روی باند غشا، منسوب به پروتئین بیان شده‌ی آنتی‌ژن BORIS در ستون بوده است که اندازه‌ی مشاهده شده با اندازه‌ی DNA واکسن مورد بررسی که ۴۷ کیلودالتون است، برابری دارد و تأیید کننده‌ی بیان پروتئین است (شکل ۱).



شکل ۱. نتیجه‌ی آزمون Western blot، ستون L: لدر،ستون ۱: تأیید بیان پروتئین در میزبان L929، ستون ۲: شاهد

بررسی تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی حاصل از واکسیناسیون با pcDNA3.1-VAC ۱۴ روز پس از آخرین تزریق واکسن، از هر گروه ۵ موش مورد خون‌گیری قرار گرفتند. پس از جداسازی سرم، با روش ELISA سطوح سرمی آنتی‌بادی‌های اختصاصی شامل IgG1، IgG2a و IgG Total در تمامی گروه‌های واکسینه شده ارزیابی گردید. سرم موش‌های واکسینه شده با pcDNA3.1-VAC، سطوح بالایی از آنتی‌بادی‌های اندازه‌گیری شده را نسبت به گروه‌های شاهد (PBS و pcDNA3.1 Original) نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$). در این اندازه‌گیری، میزان آنتی‌بادی IgG1 od: ۰/۴۵، آنتی‌بادی IgG2a od: ۰/۹۰ و IgG Total od: ۱/۷۰ بود که در گروه‌های شاهد، تمامی این آنتی‌بادی‌ها مقداری نزدیک به صفر داشتند ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۲).



شکل ۲. سطح سرمی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه مولتی اپی‌توپ واکسن در گروه‌های مختلف دو هفته پس از آخرین تزریق.

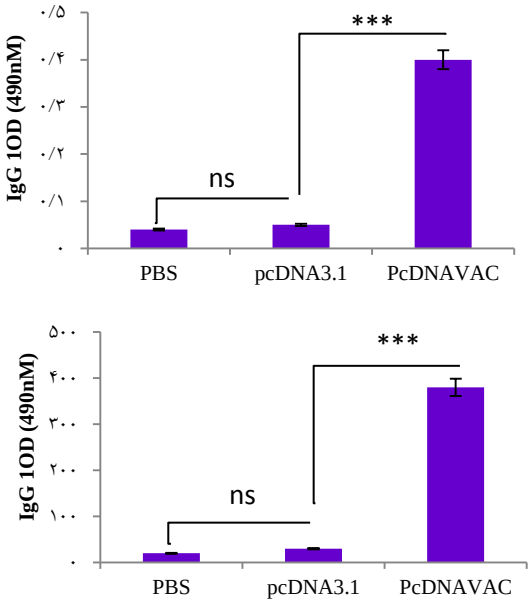
A: Immunoglobulin G1 (IgG1)، B: IgG2a، C: IgG Total

D: مقایسه‌ی آماری آنتی‌بادی‌های مختلف. دیاگرام‌های آبی **IgG1**، دیاگرام های قرمز **IgG2a** و دیاگرام‌های بنفش **IgG Total** را نشان می‌دهد. محور افقی: نوع رژیم واکسیناسیون، محور عمودی: مقدار جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر

* $P < ۰/۰۵۰$، ** $۰/۰۱۰ < P < ۰/۰۱۰$، $۰/۰۰۱ < P$

*** $P < ۰/۰۰۱$، **ns**: غیر قابل تشخیص

روش ELISA جهت بررسی تولید سیتوکین توسط سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده: سلول‌های طحال موش‌های قربانی شده پس از هموژنیزاسیون طحال، برداشت و در شرایط استریل، کشت داده شد و تولید سیتوکین‌های IFN-γ و IL-4 در آن‌ها اندازه‌گیری شد. هدف از این کار، بررسی پاسخ Th1 (IFN-γ) و یا Th2 (IL-4) در رژیم واکسیناسیون با توجه به میزان سیتوکین‌های ترشح شده بود. طبق واکاوی نتایج آزمایش ELISA مشخص گردید که رژیم واکسیناسیون با pcDNA3.1-VAC قادر به افزایش سطح سیتوکین‌های IFN-γ به میزان ۱۰ فولد و IL-4 به میزان ۹ فولد نسبت به گروه‌های شاهد (PBS و pcDNA3.1 Original) بوده است ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۳).



شکل ۳. تولید سیتوکین توسط سلول‌های طحال موش‌های واکسینه شده

A) میزان **Interleukin-4** (**IL-4**) اندازه‌گیری شده در سرم. **B**) میزان **Interferron-gamma** (**IFN-γ**) اندازه‌گیری شده در سرم.

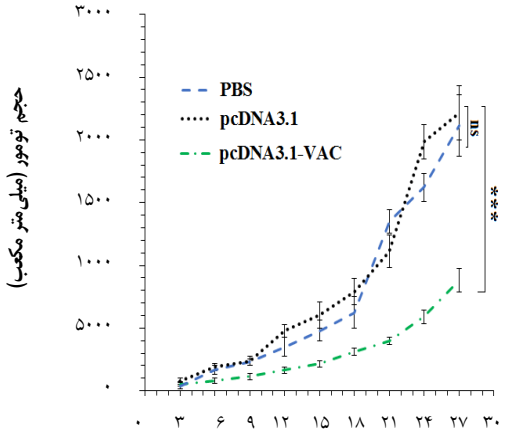
محور افقی: رژیم‌های واکسیناسیون، دیاگرام صورتی شاهد **Phosphate buffered saline** (**PBS**)، دیاگرام نارنجی شاهد دوم (**pcDNA3.1**) و دیاگرام آبی واکسن **DNA** (**pcDNA3.1-VAC**).

محور عمودی: میزان سیتوکین اندازه‌گیری شده با استفاده از روش **ELISA**

* $۰/۰۵۰ > P > ۰/۰۱۰$، ** $۰/۰۱۰ > P > ۰/۰۰۱$

*** $۰/۰۰۱ > P$، **ns**: غیر قابل تشخیص

مهار رشد تومور در رژیم‌های مختلف ایمن‌سازی: تزریق سلول‌های سرطانی ردهٔ CT26 به صورت زیر جلدی انجام شد. تزریق‌های انجام شده جهت القای تومور به موش های واکسینه شده جهت ارزیابی اثربخشی DNA واکسن برای محافظت در برابر تومور بود. در روز پانزدهم، حجم تومور گروه واکسینه شده با pcDNA3.1-VAC به میزان ۲ فولد کاهش داشت. در روز ۲۱، تعداد ۵ فولد کاهش داشت و در آخرین روز اندازه‌گیری تومورها (روز ۲۷)، ۱۰ فولد کاهش نشان داد ($P < ۰۲/۰۰۱$) (شکل ۴).



شکل ۴. اندازه‌ی تومور اندازه‌گیری شده از موش‌های ایمن شده با رژیم‌های Phosphate buffered saline (PBS)، pcDNA3.1 Original و pcDNA3.1-VAC

محور افقی: روزهای اندازه‌گیری تومور

ستون عمودی: حجم تومور

* $۰/۰۵۰ > P > ۰/۰۱۰$، ** $۰/۰۱۰ > P > ۰/۰۰۱$

*** $۰/۰۰۱ > P$، **ns**: غیر قابل تشخیص

بحث

این تحقیق به منظور بررسی اثرات مولتی اپی‌توپ DNA واکسن کد کننده‌ی قطعات ایمونوژن آنتی‌ژن BORIS بر روی تومورهای کولون در موش‌های Balb/c انجام گرفت. در بررسی انجام شده بر روی سرم نمونه‌های واکسینه شده با pcDNA3.1-VAC، آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه مولتی اپی‌توپ واکسن شامل IgG1، IgG2a و IgG Total در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش قابل توجهی داشت که نشان داد DNA واکسن، موجب ترشح آنتی‌بادی‌های اختصاصی و فعال‌سازی سیستم ایمنی هومورال می‌گردد. همچنین، جهت بررسی کارآمدی واکسن در فعال‌سازی سیستم ایمنی سلولی، میزان ترشح سیتوکین‌ها توسط کشت سلول‌های طحال و آزمایش ELISA اندازه‌گیری شد. در مقایسه با گروه‌های شاهد، میزان سیتوکین IFN-γ به میزان ۱۰ فولد و سیتوکین IL-4 به میزان ۹ فولد افزایش داشت که قابلیت فعال‌سازی لنفوسیت‌های T را نشان می‌دهد. همچنین، با مقایسه‌ی حجم تومورها و روند رشدشان بین گروه‌های واکسینه شده با pcDNA3.1-VAC و گروه‌های شاهد، کاهش رشد تومور در گروه واکسینه شده با pcDNA3.1-VAC نشان از فعال‌سازی ایمنی سلولی دارد.

در مطالعات قبلی، DNA واکسن حاصل از آنتی‌ژن BORIS در چندین مطالعه بررسی شده و اثرات ایمنی‌زایی آن تأیید گردیده است (۱۷). برای مثال، در یک تحقیق واکسیناسیون موش‌ها با سلول‌های دندریتیک که با قطعاتی از آنتی‌ژن BORIS بارگذاری شده بود، توانست به طرز چشمگیری رشد تومورهای حاصل از سرطان پستان رده‌ی 4T1 را مهار کند و کولونی‌های متاستازی را کاهش دهد (۱۷). در مطالعه‌ی دیگری، آنتی‌ژن BORIS به عنوان واکسن علیه تومورهای متاستازی پستان در موش‌های BALB/c استفاده گردید و نشان داد که موش‌های واکسینه شده بقای بیشتر داشتند و رشد تومورها در این گروه پایین‌تر بود (۱۸).

همچنین، در پژوهش دیگری، واکسنی بر پایه‌ی DNA و پروتئین BORIS طراحی گردید که به منظور افزایش پاسخ ایمنی سلولی علیه این واکسن، ادجوانت‌هایی به آن اضافه گردید. نتایج نشان داد که واکسن باعث القای تکثیر لنفوسیت‌های +CD4 T و ترشح ستوکین‌های مرتبط با Th1 و Th2 می‌گردد و نیز پروتئین واکسن، باعث القای تولید آنتی‌بادی در حیوانات مدل مورد مطالعه شد (۱۹).

در مطالعاتی که بر روی این آنتی‌ژن جهت تهیه‌ی واکسن صورت گرفت، از آنتی‌ژن تام استفاده شدگردید. اشکال استفاده از آنتی‌ژن تام، این است که ممکن است ایمنی‌زا نباشد و یا این که بدن در مقابل آنتی‌ژن تام تولرانس داشته باشد و به آن پاسخ ندهد و یا ممکن است موجب ایجاد واکنش‌های ایمنی نامطلوب نظیر آلرژی و یا عوارض خود ایمنی شود (۲۰). بدین جهت، توسط ابزارهای بیوانفورماتیک قطعات ایمونوژن مؤثر شناسایی و واکسن مورد مطالعه طراحی گردید.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی پیش رو نشان داد که مولتی اپی‌توپ DNA واکسن کد کننده‌ی قطعات ایمونوژن آنتی‌ژن BORIS، در نهایت موجب افزایش ترشح سیتوکین‌های IL-4 و IFN-γ و نیز تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی در پاسخ به مولتی اپی‌توپ DNA واکسن شد و فعال‌سازی سیستم ایمنی علیه آنتی‌ژن وابسته به تومور BORIS، توانست موجب القای پاسخ ایمنی ضد توموری و کاهش رشد تومور گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از طرح تحقیقاتی/پایان‌نامه‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی ژنتیک به کد ۱۵۰۷۹۵۲ و با کد اخلاق IR.ACECR.JDM.REC.1399.002 (مصوب جهاد دانشگاهی مشهد) می‌باشد که در گروه زیست‌شناسی دانشکده‌ی فنی و مهندسی دانشگاه علم و هنر یزد به تصویب رسیده و با حمایت مالی نسبی آقای دکتر حجازی انجام شده است. بدین وسیله، از استادان و مسؤولین محترم دانشگاه علم و هنر یزد و همچنین، استادان محترم دانشگاه علوم پزشکی اصفهان کمال تشکر و قدردانی ابراز می‌گردد.

References

1. Stein A, Folprecht G. Immunotherapy of colon cancer. Oncol Res Treat 2018; 41(5): 282-5.
2. Jahanafrooz Z, Baradaran B, Mosafer J, Hashemzaei M, Rezaei T, Mokhtarzadeh A, et al. Comparison of DNA and mRNA vaccines against cancer. Drug Discov Today 2020; 25(3): 552-60.
3. Padda IS, Parmar M. COVID (SARS-COV-2) Vaccine. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2021
4. Porter KR, Raviprakash K. DNA vaccine delivery and improved immunogenicity. Curr Issues Mol Biol 2017; 22: 129-38.
5. Gary EN, Weiner DB. DNA vaccines: Prime time is now. Curr Opin Immunol 2020; 65: 21-7.
6. Jameson SC, Masopust D. Understanding subset diversity in T cell memory. Immunity 2018; 48(2): 214-26.
7. Whitehurst AW. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2014; 54: 251-72.
8. Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, et al. Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. Mod Pathol 2014; 27(6): 899-905.
9. Fan C, Qu H, Wang X, Sobhani N, Wang L, Liu S, et al. Cancer/testis antigens: from serology to mRNA cancer vaccine. Semin Cancer Biol 2021. [Epub ahead of print].
10. Al-Khadairi G, Decock J. Cancer testis antigens and immunotherapy: Where do we stand in the targeting of PRAME? Cancers (Basel) 2019; 11(7).
11. Zajac P, Schultz-Thater E, Tornillo L, Sadowski C, Trella E, Mengus C, et al. MAGE-A Antigens and cancer immunotherapy. Front Med (Lausanne) 2017; 4: 18.
12. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, et al. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. Mol Oncol 2011; 5(2): 164-82.
13. Ogunkolade BW, Jones TA, Aarum J, Szary J, Owen N, Ottaviani D, et al. BORIS/CTCFL is an RNA-binding protein that associates with polysomes. BMC Cell Biol 2013; 14: 52.
14. Martin-Kleiner I. BORIS in human cancers -- a review. Eur J Cancer 2012; 48(6): 929-35.
15. Tiffen JC, Bailey CG, Marshall AD, Metierre C, Feng Y, Wang Q, et al. The cancer-testis antigen BORIS phenocopies the tumor suppressor CTCF in normal and neoplastic cells. Int J Cancer 2013; 133(7): 1603-13.
16. Mahdevar E, Safavi A, Abiri A, Kefayat A, Hejazi SH, Miresmaeili SM, et al. Exploring the cancer-testis antigen BORIS to design a novel multi-epitope vaccine against breast cancer based on immunoinformatics approaches. J Biomol Struct Dyn

2021; 1-18.
17. Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Davtyan H, Movsesyan N, Loukinov D, Lobanenkov V, et al. Cancer-testis antigen, BORIS based vaccine delivered by dendritic cells is extremely effective against a very aggressive and highly metastatic mouse mammary carcinoma. Cell Immunol 2011; 270(2): 188-97.
18. Loukinov D, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Ichim TE, Lobanenkov VV, Cribbs DH, et al. Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. J Cell Biochem 2006; 98(5): 1037-43.
19. Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Loukinov D, Mamikonyan G, Pack SD, Movsesyan N, et al. Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. J Immunol 2007; 178(1): 566-73.
20. Loukinov D. Targeting CTCFL/BORIS for the immunotherapy of cancer. Cancer Immunol Immunother 2018; 67(12): 1955-65.

DOI: *10.22122/jims.v39i635.14114* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 635, 3rd Week, October 2021**

Received: 05.05.2021 Accepted: 02.08.2021 Published: 19.10.2021

The Protective and Therapeutic Effect of DNA Vaccine Derived From Immunogenic Components of BORIS Antigen on Colon Cancer in Balb/C Mice

Elham Mahdevar[1], Fatemeh Gharemani[2], Amaneh Javid[3], Seyed Hossein Hejazi[4]

Original Article

Abstract

Background: Immunotherapy is a new strategy to prevent and treat cancers. Cancer-testis antigens has gained lots of attention as the target of anti-cancer immunotherapy. In this study, Brother of regulator of imprinted sites (BORIS) cancer-testis antigen was used to design a DNA vaccine using bioinformatics tools, and its efficacy was assessed in murine colon cancer model in Balb/C mice.

Methods: In our previous study, the immunodominant regions of the BORIS antigen were identified. They were used to design a DNA vaccine inside the pcDNA3.1 plasmid after appropriate modifications and reverse translation. The DNA vaccine was used to immunized BALB/c mice four times at weekly intervals. 14 days after the last injection, the levels of specific cytokines and antibodies were measured. Moreover, to evaluate the protective effect of the DNA vaccine, colorectal cancer cells (CT26) were injected into mice, and tumors' growth progression evaluated for 28 days.

Findings: Vaccination with this multiepitope DNA vaccine increased the level of gamma interferon (IFN-γ) and interleukin 4 (IL-4) cytokines ($P < 0.001$) and specific antibodies [immunoglobulin G1 (IgG1), IgG2a, IgG total] ($P < 0.001$) compared to control groups [phosphate buffered saline (PBS) and pcDNA3.1-VAC]. Moreover, mean tumors volume significantly decreased ($P < 0.001$) in the DNA vaccine immunized group compared to control groups.

Conclusion: This study suggests that the use of a BORIS antigen-derived DNA vaccine can be used as a strategy to induce a significant anti-tumor immune response, and inhibit murine colon tumors growth.

Keywords: Immunotherapy; DNA vaccine; Colorectal cancer; Plasmid; Mice, BALB C

Citation: Mahdevar E, Gharemani F, Javid A, Hejazi SH. **The Protective and Therapeutic Effect of DNA Vaccine Derived From Immunogenic Components of BORIS Antigen on Colon Cancer in Balb/C Mice.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(635): 564-71.

1- Department of Biology, School of Science and Engineering, Science and Arts University, Yazd, Iran
2- Assistant Professor, Department Radiotherapy, School of Paramedicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science and Engineering, Science and Arts University, Yazd, Iran
4- Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center AND Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi, Professor, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center AND Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: hejazi@med.mui.ac.ir