مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۱/هفته چهارم دی ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۲۱

بررسی تأثیر miR–۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در رده‌ی سرطان معده‌ی انسانی MKN–۴۵

ثریا قاسمی[۱]، دکتر حسین مزدارانی[۲]، دکتر مسعود سلیمانی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان معده، از متداول‌ترین سرطان‌ها در جهان و دومین عامل مرگ انسان در اثر سرطان است. MicroRNAs گروهی از RNAهای درون‌زاد کوچک غیر کد کننده با طول ۲۳–۲۱ نوکلئوتید هستند. افزایش بیان MiR–۳۷۲ در برخی سرطان‌ها، با کاهش بیان هدف آن (LATS۲) نقش انکومیری دارد. کاهش بیان LATS۲ منجر به عدم تنظیم چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و تکثیر سلولی می‌گردد.

روش‌ها: در این مطالعه، با استفاده از ترانسداکشن لنتی ویروس، بیان miR–۳۷۲ در رده‌ی سلولی MKN–۴۵ افزایش یافت. پس از انتخاب سلول‌های مثبت، میزان بیان miR–۳۷۲ و LATS۲ با تکنیک Real time PCR (Real time polymerase chain reaction)، اندازه‌گیری شد. روش سنجش میکرونوکلئی، جهت بررسی وجود یا عدم وجود میکرونوکلئی برای مقایسه‌ی ناپایداری ژنومیک در سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR–۳۷۲ در مقایسه با سلول‌های شاهد، انجام شد.

یافته‌ها: در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد، مقدار بیان miR–۳۷۲ به طور معنی‌داری در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترانسداکشن، به ترتیب ۷/۸۵، ۵۰/۲۲ و ۱۱۴/۶۸ برابر افزایش یافت (P = ۰/۰۳۰). بیان LATS۲ در مقایسه با سلول‌های شاهد، در این روزها به ترتیب ۰/۳۹، ۰/۲۹ و ۰/۱۵ برابر کاهش یافت (P = ۰/۰۱۶). همچنین، ناپایداری ژنومیک سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد به میزان معنی‌داری افزایش یافت (P < ۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: در رده‌ی سلولی MKN–۴۵، LATS۲ هدف miR–۳۷۲ است. با افزایش بیان miR–۳۷۲، LATS۲ کاهش بیان می‌یابد. کاهش LATS۲ منجر به ناپایداری ژنومیک در طی تقسیم سلول و ایجاد میکرونوکلئی می‌گردد و از این رو، می‌تواند بازدارنده‌ی توموری مهمی در سرطان معده باشد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، miR–۳۷۲، LATS۲، ناپایداری ژنومیک

ارجاع: قاسمی ثریا، مزدارانی حسین، سلیمانی مسعود. **بررسی تأثیر miR–۳۷۲ بر ناپایداری ژنومیکی در رده‌ی سرطان معده‌ی انسانی MKN–۴۵**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۱): ۲۰۴۷–۲۰۳۵

مقدمه

سرطان معده، یکی از متداول‌ترین سرطان‌ها در سطح جهان و دومین عامل مرگ و میر در انسان است.کارسینوژنز معده، فرایندی چند مرحله‌ای است. هر چند تغییرات ژنتیکی درگیر در شروع و پیشرفت این سرطان، هنوز به خوبی مشخص نیست، اما عوامل

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین مزدارانی
Email: mozdarah@modares.ac.ir

ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی مختلفی برای آن در نظر گرفته‌اند (۱). از زمان شناسایی miRNAs (MicroRNAs)، مشخص شده است که miRNAs نیز از مواردی هستند که در تومورزایی انسان درگیرند. با کشف این موضوع فصل جدیدی از مطالعه جهت شناسایی علل و درمان سرطان‌های انسانی گشوده شده است (۲).

miRNAs، RNAهای درون‌زاد (Endogenesis) و غیر کد کننده با طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید هستند (۴-۳). miRNAs می‌توانند به صورت مکمل به توالی مناطق غیر ترجمه شونده (۳'-UTR یا ۳'-Untranslated region) mRNA هدف، متصل گردند و منجر به مهار پس از رونویسی آن گردند (۶-۵). برخی miRهای درگیر در فرایندهای مختلف سرطانی شدن، نقش انکوژنی و برخی نقش بازدارندگی از تومور دارند. miRهایی که بیان ژن‌های بازدارنده‌ی توموری و یا ژن‌های درگیر در فرایندهای تمایز سلولی را کم می‌کنند و بنابراین با القای تکثیر، رگ‌زایی و تهاجم، منجر به شکل‌گیری تومور می‌گردند، OncomiRs نام دارند. به طور مشابه، miRهایی که بیان ژن‌های دارای فعالیت انکوژنی را کاهش می‌دهند، miRهای بازدارنده‌ی تومور نامیده می‌شوند (۷). عملکردهای متنوعی در رابطه با سرطان‌ها برای این دو گروه miR شناخته شده است (۱۰-۸). با استفاده از پروفایل‌های بیانی miRNAs در تومورهای انسانی، به نظر می‌رسد تغییر در بیان طبیعی miRNAs با تشخیص، پیش‌آگهی، مراحل تکامل و پاسخ به درمان در سرطان‌ها مرتبط هستند (۱۱).

مطالعات با استفاده از پروفایل‌های miRNAs نشان می‌دهد که برخی miRNAs در سرطان معده نیز دچار افزایش و یا کاهش بیان می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد miRNAs مرتبط با مراحل مختلف سرطان معده، در تشخیص زودهنگام این سرطان مؤثر هستند (۱۴-۱۲). miRNAs که به عنوان نشانگرهای زیستی (Biomarkers) برای سرطان معده اثبات و مشخص شده‌اند، دارای پتانسیل‌هایی هستند که ممکن است با دست‌ورزی آن‌ها بتوان در آینده به اثرات درمانی جدید این سرطان دست یافت (۱۵).

miR-۳۷۲ در بافت‌های طبیعی و سرطانی مختلف، ژن‌های هدف متنوعی دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند، افزایش بیان miR-۳۷۲ در سلول‌های برخی سرطان‌ها، می‌تواند با تأثیر بر میزان بیان بازدارنده‌ی تومور (Tumor suppressors) LATS۲ (Large tumor suppressor kinase۲)، در بر هم زدن تنظیم چرخه‌ی سلولی، تکثیر سلولی و آپوپتوز، نقش انکومیری (Oncomir) داشته باشد (۲۰-۱۶، ۱۳). LATS۲ بازدارنده‌ی توموری است که در عملکرد صحیح سانتروزوم‌ها، القای آپوپتوز، برخی نظارت (Checkpoints)های سلولی، تنظیم چرخه‌ی سلولی و حفظ ثبات ژنتیکی سلول در حین تقسیم میتوز، نقش تنظیم کننده دارد (۲۳-۲۱). نقش miR-۳۷۲ تاکنون در سرطان معده، تنها در مطالعه‌ی Cho و همکاران بررسی شده است. این مطالعه نشان داد رده‌ی سلولی سرطان معده‌ی انسانی AGS نسبت به رده‌های دیگر سرطان معده، بیان بالاتری از miR-۳۷۲ دارد و از طریق کاهش میزان بیان LATS۲ منجر به ویژگی‌های تومورزایی در این رده‌ی سلولی می‌گردد. کاهش miR-۳۷۲ از طریق ترانسفکشن الیگونوکلئوتید مکمل آن، میزان پروتئین LATS۲ را افزایش می‌دهد و باعث کاهش سرعت رشد سلول‌ها و افزایش

آپوپتوز در این رده‌ی سلولی می‌گردد (۱۷).

سرطان معده، به جز در مراحل پیشرفته علایم خاصی ندارد. از این رو، شناسایی نشانگرهای زیستی برای تشخیص سریع‌تر این سرطان، گامی اساسی در درمان مؤثرتر این سرطان است (۲۴). در مطالعات مختلف، نقش miR-۳۷۲ در سایر سرطان‌ها (۱۷-۱۳، ۱۰) و نقش LATS۲ در صحت و پایداری ژنومی در سلول‌های فیبروبلاستی (۲۳-۲۱) نشان داده شده است.

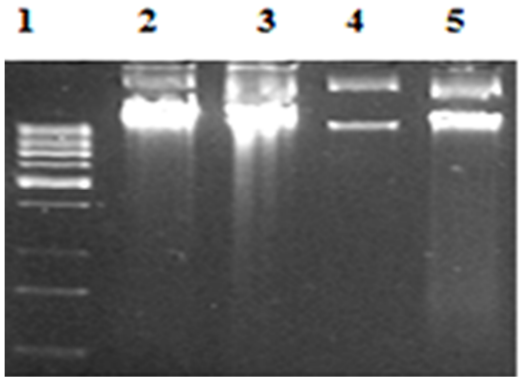
با توجه به شواهدی که نشان دهنده‌ی شباهت نقش miR-۳۷۲ در ایجاد برخی ویژگی‌های اختصاصی در مراحل اولیه‌ی سرطان معده، به خصوص سرعت بالای تقسیم سلولی بدون ترمیم ماده‌ی ژنتیکی سلول‌ها است (۲۵، ۱۷) و از آن جا که پیرامون نقش miR-۳۷۲ در سرطان معده، مطالعه‌ی چندانی صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه آشکارسازی اثر افزایش بیان القایی miR-۳۷۲ با استفاده از ترانسداکشن لنتی ویروس حامل آن، در رده‌ی سلولی MKN-۴۵ بر بیان LATS۲ بود. در این مطالعه، همچنین برای اولین بار، تأثیر افزایش بیان القایی miR-۳۷۲ بر تغییر در پایداری ژنومیکی در رده‌ی سلولی MKN-۴۵ بررسی گردید.

روش‌ها

تهیه‌ی پلاسمیدها

با ترانسفکشن پلاسمیدهای حامل قطعات ژنوم لنتی ویروسی در سلول مناسب جهت بسته‌بندی و ایجاد ذرات ویروسی، ذرات ویروسی بسته‌بندی و تهیه شدند. پلاسمیدهای مورد نیاز در تهیه‌ی ذرات لنتی ویروس (از شرکت abm، Canada) خریداری شدند. پلاسمیدها به صورت جداگانه، در باکتری مستعد E.coli (Escherichia coli) سوش DHFα، با روش شوک حرارتی و با کمک بافر کلرید کلسیم (۱ M) تغییر شکل یافتند. باکتری‌های تغییر شکل یافته، با کشت شبانه، در محیط کشت باکتری جامد حاوی آنتی‌بیوتیک پروکاریوتی مناسب که پلاسمیدها حامل ژن مقاومت آن هستند، تکثیر شدند. از هر پلیت کشت باکتری که حاوی تعداد متعددی کلونی باکتری بود، یک تک کلونی به محیط LB (Lysogeny broth) مایع حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب منتقل شد.

پس از کشت شبانه در انکوباتور شیکردار و با انتقال ۵۰۰ µl از محیط کشت حاوی باکتری به ۵۰ ml محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک، باکتری‌ها، جهت کشت شبانه به انکوباتور شیکردار، منتقل گردید. پس از این زمان، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeneAll, Korea) پلاسمیدها به صورت جداگانه، استخراج شدند و کمیت و کیفیت آن‌ها با استفاده از میزان جذب نوری و ران نمودن بر روی ژل آگارز تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱. نمونه‌ای از الکتروفورز پلاسمیدهای مورد استفاده در بسته‌بندی ویروس، بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۳ µl از هر پلاسمید به همراه ۱ µl ژل رد ران گردید. از سمت چپ ۱: نشانگر ۱، ۲: psPAX۲، ۳: pMD۲.G، ۴: Lenti- blank، ۵: miR-۳۷۲Lenti-

بسته‌بندی لنتی ویروس و ترانسداکشن miR-۳۷۲

سلول‌های کلیه‌ی جنین انسانی (HEK۲۹۳T یا Human embryonic kidney)، سلول‌هایی مناسب جهت بسته‌بندی ویروس (Virus packaging) و تهیه‌ی ذرات ویروسی هستند و در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. این رده‌ی سلولی در شرایط کشت در محیط کشت سلولی Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; GIBCO-BRL) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS یا Fetal bovine serum) (GIBCO-BRL) در پلیت‌های ۱۰ cm در شرایط انکوباتور، با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ ^oC کشت داده شد. محیط کشت سلول، هر دو روز یک بار تعویض شد. لنتی ویروس با استفاده از ترانسفکشن همزمان سه پلاسمید حامل قطعات مختلف ژنوم لنتی ویروس، با بافر کلسیم فسفات در غلظت و اسیدیته‌ی مناسب، در سلول‌های HEK ۲۹۳T تهیه شد.

سلول‌های ۲۹۳T (HEK) پس از کشت و رسیدن به تعداد تقریبی ۵ × $۱۰^۶$، که حدود ۷۵ درصد سطح پلیت را پوشش داد، در مرحله‌ی لگاریتمی رشد سلول‌ها، با استفاده از پلاسمید حامل ژن‌های پوششی، pMD۲G، پلاسمید بسته‌بندی psPAX۲ و پلاسمید حامل miR-۳۷۲ و نشانگر GFP (Green fluorescent protein، cat#mh۱۱۱۳۲) (Lenti Mira-GFP-has-miR-۳۷۲ vector) و در پلیت دیگر به عنوان شاهد با استفاده از پلاسمیدهای pMD۲G، psPAX2 و پلاسمید شاهد حامل GFP (Lenti GFP-blank vector، cat#m۰۰۱) به طور جداگانه ترانسفکت گردید. محیط سطح این سلول‌ها، پس از ۲۴ ساعت حاوی ذرات ویروسی خواهد بود. محیط حاوی ویروس، تا ۷۲ ساعت با فواصل ۲۴ ساعت یک بار، جمع‌آوری گردید. پس از فیلتراسیون، تغلیظ محیط کشت حاوی ویروس انجام شد. با استفاده از PEG ۸۰۰۰ (Polyethylene glycol ۸۰۰۰) و ۱۶ ساعت Shake شدن در دمای ۴ ^oC و در نهایت سانتریفوژ با دور بالا، پلت ویروسی حاصل شد که در مقدار ۵۰۰ µl محیط کشت سوسپانسیون و در دمای ۷۰- ^oC، نگهداری گردید.

سپس با تیتراسیون نمودن، تعداد ذرات ویروسی در واحد حجم تعیین شد. جهت تیتراسیون، ترانسداکشن حجم‌های مشخصی از محیط تغلیظ شده حاوی ویروس در تعداد ۶۰۰۰۰ سلول HEK۲۹۳T و تعیین درصد تعداد سلول‌های سبز (GFP^+) با فلوسایتومتری، صورت گرفت. به این ترتیب، با محاسبه‌ی نسبت سلول‌های GFP^+ و حجم مورد استفاده از محیط حاوی ویروس، تعداد ذرات ویروسی تهیه شده در واحد حجم به دست آمد.

کشت و ترانسداکشن رده‌ی سلولی MKN-۴۵

رده‌ی سلولی سرطان معده‌ی انسانی (MKN-۴۵)، در محیط کشت سلولی (DMEM; GIBCO-BRL) به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۱۰ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین (GIBCO-BRL)، با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ ^oC در شرایط انکوباتور در فلاسک‌های کشت سلول T۲۵، کشت داده شد. محیط کشت سلول، هر دو روز یک بار تعویض شد. سلول‌ها در صورت نیاز با استفاده از تریپسین_EDTA ۰/۲۵ (GIBCO-BRL) از کف ظرف کشت جدا شدند.

جهت به دست آوردن بهترین غلظت استفاده از ویروس جهت ترانسداکشن در این رده‌ی سلولی

(Multiplicity of infection یا MOI)، ۲۰۰۰۰ سلول در تعدادی چاهک از یک پلیت ۴۸ خانه کاشته شد. غلظت‌های مختلف ویروس با ۳، ۵ و ۱۰ برابر تعداد سلول‌های کاشته شده در هر چاهک، به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۱۶ ساعت از ترانسداکشن، محیط حاوی ویروس، از سطح سلول‌ها با محیط کشت تازه، تعویض شد. سلول‌ها جهت بررسی مورفولوژی و میزان GFP^+ بودن توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت مشاهده شدند و مناسب‌ترین میزان ویروس جهت ترانسداکشن این رده‌ی سلولی انتخاب شد.

جهت افزایش کارایی ترانسداکشن ۲ µg/ml Polybrene (Aldrich, No. H۹۲۶۸; Sigma- Hexadimethrine bromide) به محیط کشت افزوده شد. ذرات ویروسی حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک یوکاریوتی پورومایسین هستند. جهت به دست آوردن رده‌ی سلولی MKN-۴۵، با بیان پایدار و خلوص بالای سلول‌های GFP^+ ۲ µg/ml آنتی‌بیوتیک پورومایسین، پس از ۴۸ ساعت از زمان ترانسداکشن، جهت انتخاب سلول‌های GFP^+ استفاده شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real time PCR

جهت Real time PCR (Real time polymerse chain reaction)، با استفاده از سایت primer۳PLUS برای LATS۲ cDNA و GAPDH cDNA (phosphate -۳- dehydrogenase complementary DNA (Glyceraldehyde پرایمرهای رفت و برگشت و با استفاده از سایت IDT برای miR-۳۷۲ cDNA و RNAU۶B cDNA پرایمرهای رفت، (پرایمرهای برگشت در کیت تعبیه شده است) طراحی شد. جدول ۱، توالی پرایمرهای طراحی و استفاده شده در این تحقیق را نشان می‌دهد. از زمان ترانسداکشن به مدت ۲۱ روز و با فاصله‌های زمانی ۷ روز یک بار، از سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲ و لنتی ویروس شاهد و نیز سلول‌های تیمار نشده، با استفاده از RiboEx reagent (GeneAll, Korea) استخراج RNA تام صورت گرفت. RNA استخراج شده در روزهای ذکر شده، جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت (thermo#K۱۶۲۱) با پرایمر oligo (dT) جهت بررسی میزان تغییرات بیان LATS۲ و با استفاده از کیت (Stratagene#۶۰۰۵۴۵)، جهت بررسی تغییرات بیان miR-۳۷۲ استفاده شد. تغییرات بیان LATS۲ با استفاده از GAPDH به عنوان شاهد داخلی و کیت (TAKARA#RR۸۲۰A) و تغییرات بیان miR-۳۷۲ با استفاده از RNAU۶B به عنوان شاهد داخلی و کیت (Stratagene#۶۰۰۵۴۵) بررسی شد. Real time PCR در دستگاه ABI Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) انجام شد. بیان نسبی با روش $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ بررسی شد.

سنجش میکرونوکلئی (MN assay یا Micronuclei assay)

سلول‌های ترانسداکت شده و شاهد در فلاسک‌های کشت سلول T۲۵، با ۴ µg/ml (۱۰۰ µl/۵ml: Sigma) Cyt-B (Cytochalasin B) به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور کشت سلول، انکوبه شدند. پس از این زمان، سلول‌ها از ظروف کشت با استفاده از تریپسین-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) محصول‌برداری شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS (Phosphate buffered saline) سرد و سانتریفیوژ نمودن آن‌ها به مدت ۵ دقیقه در

rpm ۱۲۰۰، سلول‌ها در ۰/۰۷۵ M از KCl سرد سوسپانسیون شدند و پس از سانتریفیوژ، پلت‌های سلولی در محلول فیکس (۳:۱ متانول: اسید استیک) سوسپانسیون شدند و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق دوباره سانتریفیوژ گردیدند. پس از دو بار شستشو در محلول فیکس دوم (۶:۱ متانول: اسید استیک) و سوسپانسیون نمودن در این محلول، سلول‌ها به یک لام شیشه‌ای تمیز منتقل شدند. سپس سلول‌ها در گیمسای ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشوی گیمسای اضافه با آب و خشک شدن، لام‌ها جهت بررسی هسته‌ها و شمارش هزار سلول دو هسته‌ای در هر گروه سلول و به دست آوردن تعداد سلول‌های دو هسته‌ای حاوی میکرونوکلئای در این میان، با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ استفاده شدند.

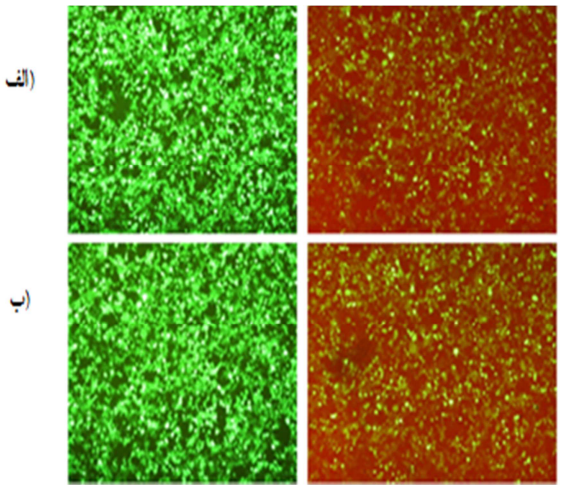
سنجش آماری

همه‌ی بررسی‌ها حداقل سه مرتبه تکرار شدند. نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شدند. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری نتایج آماری در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) بررسی شد.

یافته‌ها

تهیه‌ی پلاسمیدها و بسته‌بندی ویروس در سلول‌های HEK۲۹۳T

پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌ها، از کیفیت مطلوبی برخوردار بود (شکل ۱). بعد از ۴۸ ساعت از ترانسفکشن پلاسمیدها، سلول‌های HEK۲۹۳T، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. از آن جا که پلاسمید حامل miR-۳۷۲ استفاده شده جهت تهیه‌ی لنتی ویروس حامل ژن پروتئین سبز فلورسنتی (GFP) است، رنگ سبز سلول‌ها (بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها GFP^+ بود) نشان دهنده‌ی ترانسفکشن صحیح و بسته‌بندی و شکل‌گیری ذرات ویروسی در این سلول‌ها بود (شکل ۲). با تیتراسیون و تعیین درصد میزان GFP^+ سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت از ترانسداکشن، مشخص شد تعداد ذرات ویروسی در هر میکرولیتر از محیط کشت پس از تغلیظ نمودن، ۱۱۲۵ ذره‌ی ویروسی می‌باشد.



شکل ۲. سلول‌های HEK-۲۹۳T: پس از ۴۸ ساعت از ترانسفورماسیون، با میکروسکوپ فلورسنت رنگ سبز GFP (Green fluorescent protein) در این سلول‌ها مشاهده شد که نشان دهنده‌ی کارآمد بودن ترانسفورماسیون و تولید لنتی ویروس بود. الف) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲ و ب) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد

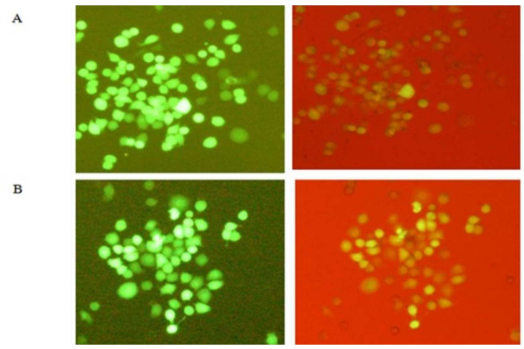
ترانسداکشن لنتی ویروس

کارایی MOIهای مختلف لنتی ویروس برای رده‌ی سلولی MKN-۴۵ با استفاده میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد. با ترانسداکت نمودن

مقدارهای مختلف لنتی ویروس بر این رده‌ی سلولی، مشخص شد بهترین MOI برای این رده‌ی سلولی MOI۵ بود؛ به این معنی که ترانسداکشن این رده‌ی سلولی در MOI پایین‌تر از این مقدار، کارایی کمی داشت و درصد اندکی از سلول‌ها GFP^+ بودند. در MOI بالاتر نیز سلول‌ها مورفولوژی طبیعی خود را از دست دادند و توانایی زنده ماندن چندانی نداشتند. در MOI۵، سلول‌ها در شرایط مورفولوژی مساعد بودند و حدود ۴۲ درصد سلول‌ها GFP^+ بودند. در نهایت، با انتخاب آنتی‌بیوتیکی سلول‌های ترانسداکت شده، با استفاده از پوروماسین، بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها، GFP^+ بودند (شکل ۳). کشت این سلول‌ها تا رسیدن به تعداد کافی جهت بررسی‌های بعدی ادامه یافت.

نتایج Real time PCR

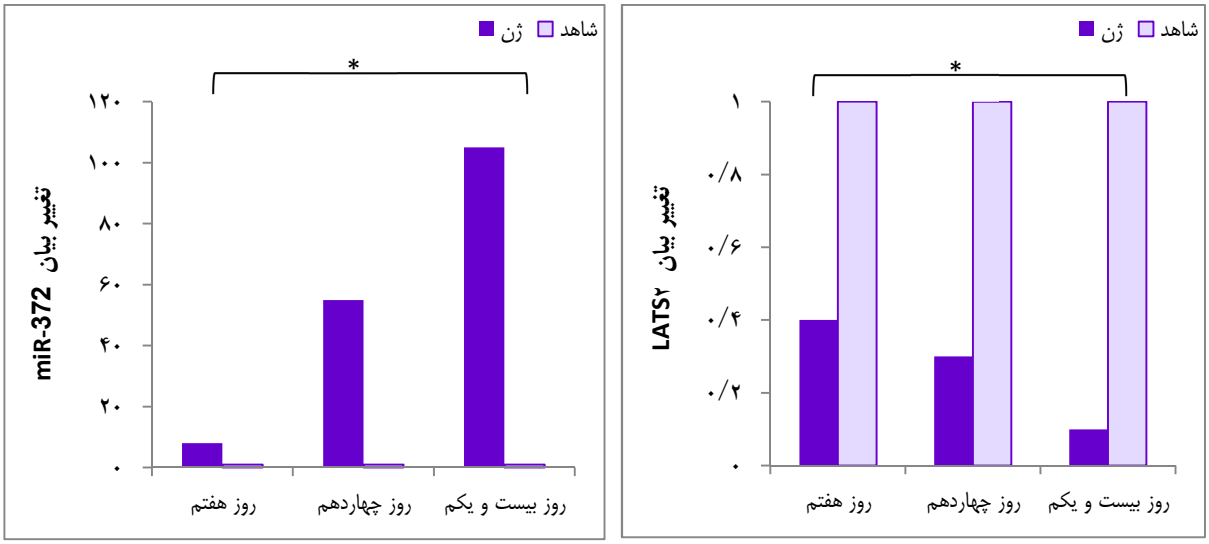
با استفاده از پرایمرهای طراحی شده جهت Real time PCR، Real Time PCR انجام شد (جدول ۱). پس از آنالیز اطلاعات حاصل از Real time PCR، نتایج نشان داد که میزان بیان miR-۳۷۲ در اثر ترانسداکشن افزایش معنی‌داری یافت و در روز ۷ به ۷/۸۵، در روز ۱۴ به ۵۰/۲۲ و در روز ۲۱ پس از ترانسداکشن، به بیش از ۱۱۴ برابر سلول‌های شاهد رسید (P = ۰/۰۳۰). افزایش بیان miR-۳۷۲ تا ۲۱ روز پس از ترانسداکشن، نشانه‌ی پایدار بودن انتقال ژن و پایدار بودن بیان miR-۳۷۲ در رده‌ی سلولی ترانسداکت شده می‌باشد. از طرفی، بیان LATS۲، کاهش معنی‌داری نشان داد. میزان بیان LATS۲ در این روزها، به ترتیب به ۰/۳۹، ۰/۲۹ و ۰/۱۵ برابر سلول‌های شاهد رسید (P = ۰/۰۱۶). این کاهش معنی‌دار نشان دهنده‌ی آن است که mRNA LATS۲ توسط miR-۳۷۲ مورد هدف قرار گرفته است. میزان تغییرات بیان در بین گروه ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد و سلول‌های تیمار نشده، تغییر معنی‌داری نداشت (شکل ۴).



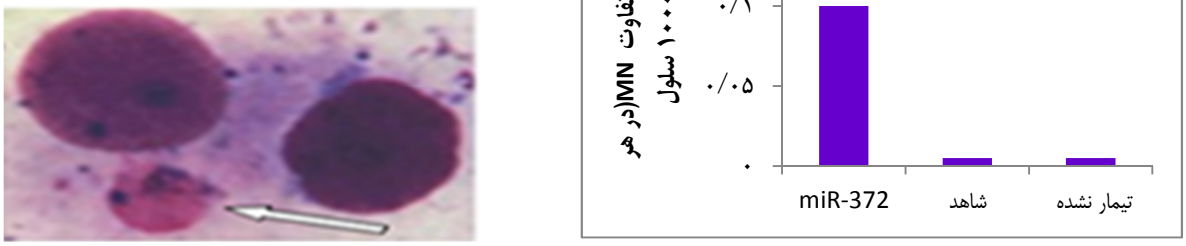
شکل ۳. بیش از ۹۰ درصد سلول‌های رده‌ی سلولی MKN-۴۵ پس از انتخاب سلول‌های ترانسداکت شده توسط آنتی‌بیوتیک یوکاریوتی پروماسین، به صورت ثابت GFP^+ هستند. A) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲، B) سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس شاهد

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

توالی	پرایمر
۵- CACTCAACTCTGTGACTGGTG -'۳	LATS۲-Forward
۵ CCAGTTGATCACCTTCAGC -'۳	LATS2-Reverse
۵-CTCTCTGCTCCTCCTGTTCG-'۳	GAPDH-Forward
۵-ACGACCAAATCCGTTGACTC-'۳	GAPDH-Reverse
۵-AAAGTGCTGCGACATTTGAG-'۳	miR-۳۷۲-Forward
۵-AAATTGGAACGATACAGAGAAG-'۳	RNAU۶B-Forward



شکل ۴. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از ترانسداکشن، تغییر بیان miR-۳۷۲ و LATS۲ بررسی شد. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه گردید. سطح بیان miR-۳۷۲ با RNAU۶B به عنوان شاهد داخلی طبیعی‌سازی گردید. هیچ تغییری در میزان بیان miR-۳۷۲ در گروه آلوده شده با وکتور خالی لنتی ویروسی نسبت به گروه شاهد دیده نشد (P > ۰/۰۵۰). سطح بیان LATS۲ با GAPDH (Glyceraldehyde-۳-phosphate dehydrogenase) به عنوان شاهد داخلی طبیعی‌سازی گردید. هیچ تغییری در میزان بیان LATS۲ در گروه ترانسداکت شده با وکتور خالی لنتی ویروسی نسبت به گروه شاهد دیده نشد (P > ۰/۰۵۰)



شکل ۵. سنجش میکرونوکلئی: سلول‌های دو هسته‌ای دارای میکرونوکلئی. پیکان میکرونوکلئی را نشان می‌دهد. میزان تفاوت MN (میکرونوکلئی) در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای شمارش شده در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱)

سنجش میکرونوکلئی

ایجاد میکرونوکلئی در سلول‌های در حال تقسیم، نشان دهنده‌ی ناپایداری ژنومیکی و عدم حفظ ثبات و تقسیم مساوی ماده‌ی ژنتیکی بین دو سلول دختری است. سیتوکالازین B، سیتوکیناز را در چرخه‌ی سلولی میتوزی باز می‌دارد و باعث ایجاد سلول‌های دو هسته‌ای می‌گردد. در صورت عدم تقسیم مساوی ماده‌ی ژنومیکی بین سلول‌ها و ناپایداری‌های ژنومیکی، سلول‌های دو هسته‌ای حامل میکرونوکلئی خواهند بود.

در این مطالعه، همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته شمارش شده در هر گروه از سلول‌های تیمار شده و سلول‌های شاهد، تفاوت معنی‌داری بین سلول‌های

تیمار شده و شاهد حامل میکرونوکلئی دیده شد (P < ۰/۰۰۱). تفاوت آماری تعداد سلول‌های حامل میکرونوکلئی بین سلول‌های ترانسداکت شده‌ی شاهد و ترانسداکت نشده، معنی‌دار نبود.

بحث

نشانگرهای زیستی اختصاصی و بسیار حساس برای تشخیص سرطان معده در مراحل اولیه بسیار ناکافی هستند. از آن جا که بقای بیماران بستگی به مراحل سرطان معده دارد، ضروری است که نشانگرهای زیستی مولکولی برای تشخیص‌های ابتدایی این سرطان و نیز پیشرفت‌های درمانی آن در آینده شناسایی شوند (۲۶). MiRs در شبکه‌های پیچیده‌ی تنظیم بیان ژن‌های مختلف، نقش‌های با اهمیتی دارند (۲۷). miRs کاندیداهای مورد قبولی برای پیشرفت حساسیت تشخیصی نشانگرهای توموری برای مراحل پایین و بنابراین افزایش شانس بقای بیماران سرطانی هستند. مطالعات مختلف، اهمیت آن‌ها را در این زمینه نشان داده است (۲). مطالعات عملکردی miRNAs نیز نشان دهنده‌ی دخالت آن‌ها در فرایندهای مولکولی و زیست شناختی منجر شونده به تومورزایی است. در دهه‌ی گذشته، شواهد فراوانی از نقش عدم تنظیم بیان miRs در پاتوژنز و پیشرفت تومورهای انسانی از جمله سرطان معده، منتشر شده است (۲۸). امروزه از miRNAs با عنوان نشانگرهای زیستی جدید سرطان، یاد می‌شود (۲۹).

از طرفی، ارتباط عدم تنظیم miRs با سرطان‌ها پتانسیل بالای استفاده از آن‌ها به عنوان اهداف درمانی مداخله‌ای را نشان می‌دهند. طبق نتایج تحقیقات قبلی، از آن جایی که miRNAs با مراحل مختلف سرطان معده مرتبط هستند، شناسایی زودهنگام آن‌ها به عنوان نشانگر زیستی قابل توجه است (۱۴). در این مطالعه، نقش miR-۳۷۲ جهت شناسایی ژن هدف و عملکرد مرتبط با آن در سرطان معده در in vitro در رده‌ی سلولی MKN-۴۵ برای اولین بار بررسی شد. نقش miR-۳۷۲ در سرطان‌های مختلفی بررسی و اثبات شده است.

Voorhoeve و همکاران نشان دادند که miR-۳۷۲ و miR-۳۷۳ در تومورهای سلول‌های زایای بیضه نقش انکوژنی دارند (۱۶). به علاوه، در مطالعه‌ای بر روی ۱۴۴ بیمار با سرطان روده‌ی بزرگ نیز نشان داده شد که miR-۳۷۲ به واسطه‌ی کاهش LATS۲ منجر به تومورزایی در این سرطان می‌گردد (۱۸).

Belair و همکاران نشان دادند که بیان miR۳۷۱-۳ در عفونت هلیکوباکتر پیلوری کاهش می‌یابد. کاهش miR-۳۷۲ با افزایش بیان LATS۲ مرتبط است (۲۵). miR-۳۷۲ در مراحل پیشرفت سرطان گلیوما، LATS۲ را مورد هدف قرار می‌دهد و با پیشرفت مراحل گلیوما مرتبط است (۳۰). Yu و همکاران نشان دادند که miR-۳۷۲ یکی از ۵ MicroRNA است که در زنده ماندن بیماران مبتلا به سرطان NSCLC (Non-small cell lung cancer) مؤثر است. بیان LATS۲ در بافت‌های مبتلا به سرطان در مقایسه با بافت سالم اطراف، در این بیماران کاهش یافته است (۱۹).

از سوی دیگر، در سرطان‌های کبد و سرویکس مشخص شده است که miR-۳۷۲ از طریق مسیرهای سیگنالینگی دیگری نقش بازدارندگی از تومور دارد و در سلول‌های این سرطان‌ها نسبت به بافت‌های سالم اطراف کاهش بیان یافته است (۳۲-۳۱). از این رو،

ممکن است miR-۳۷۲ در سرطان‌های مختلف نقش‌های متنوعی داشته باشد و مسیرهای سیگنالینگی مختلفی را هدف قرار دهد. از این رو لازم است نقش miR-۳۷۲ در سرطان‌های مختلف بررسی و مسیر سیگنالینگی آن در هر سرطان مشخص شود. در این مطالعه، مشخص شد که افزایش القایی بیان miR-۳۷۲ باعث کاهش معنی‌داری در میزان بیان LATS۲ در سلول‌های سرطان معده در in vitro می‌گردد. این نتیجه نشان داد در سلول‌های سرطان معده همچون برخی سرطان‌های دیگر، miR-۳۷۲ حداقل یکی از عوامل تنظیم کننده‌ی میزان بیان LATS۲ است. LATS۲ یک پروتئین کیناز مهم در تنظیمات چرخه‌ی سلولی است و عملکرد بازدارندگی از تومور دارد (۱۹-۱۶).

نتایج بررسی تغییرات بیان در این مطالعه، بر روی سلول‌های رده‌ی MKN-۴۵ از سرطان معده، نتایج مطالعه‌ی Cho و همکاران را در رده‌ی سلولی سرطان معده AGS (۱۷) تأیید کرد و نتیجه‌ی مشابهی با سرطان‌های کولون، بیضه و گلیوما داشت (۲۰-۱۶). گروهی از محققین ثابت کردند که رده‌ی سلولی ۴۵-MKN، به میزان چشمگیری حاوی سلول‌های $CD۴۴^{+}$ است (۳۳). گلستانه و همکاران نشان دادند که سلول‌های $CD۴۴^{+}$ که بیش از ۹۰ درصد این رده‌ی سلولی هستند، miR-۳۷۲ را به میزان کمی بیان می‌کنند (۳۴). با توجه به این یافته‌ها، انتخاب این رده‌ی سلولی برای افزایش بیان القایی miR-۳۷۲ در این مطالعه مناسب است. در این مطالعه، بررسی نقش miR-۳۷۲ در سرطان معده در in vitro نشان داد که بیان القایی بالای miR-۳۷۲ با استفاده از لنتی ویروس حامل آن در رده‌ی سلولی MKN-۴۵ به میزان معنی‌داری بیان LATS۲ را کاهش می‌دهد.

محققین نشان دادند که سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش $Lats۲^{-/-}$ نقایص سیتوکینازی افزایش یافته‌ای را نشان می‌دهند. از این رو، تجمع میکرونوکلئی، سانتروزوم‌های اضافه و آنیوپلوئیدی در این سلول‌ها افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. بنابراین گمان می‌شود این بازدارنده‌ی توموری، ممکن است نقش مهمی در حفظ صحت میتوزی و یکپارچگی ژنومی داشته باشد. حجیم شدن هسته و چند هسته‌ای شدن، نتایج فقدان LATS۲ هستند (۳۵، ۲۳). بیشتر این ویژگی‌ها در سلول‌های برخی سرطان‌ها نیز مشاهده می‌گردد. در مطالعات اخیر مشخص شده است که ناهنجاری‌های سانتروزومی می‌توانند در ایجاد بدخیمی‌ها دخیل باشند. در سلول‌های سرطانی، مورفولوژی‌های ناهنجار هسته‌ای، همچون هسته‌ی حجیم و پلوئیدی، میکرونوکلئی و چند هسته‌ای شدن، به عنوان اختلالات ناشی از ناهنجاری‌های سانتروزومی شناخته می‌شوند (۳۷-۳۶، ۲۳).

در این بررسی برای اولین بار، افزایش قابل توجه میکرونوکلئی در سلول‌های تیمار شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲ نسبت به سلول‌های شاهد، نشان می‌دهد کاهش بیان بازدارنده‌ی توموری هدف آن (LATS۲)، ممکن است نقش مهمی در ناپایداری ژنومی داشته باشد (شکل ۵). این تفاوت ناشی از کاهش میزان بیان LATS۲ است که نقش بسیار مهمی در صحت تقسیم ژنومیک در حین تقسیم میتوزی در سلول‌های دختری دارد. با وجود این مشاهدات و نتایج در تومورهای مختلف، گمان می‌رود miR-۳۷۲ از طریق بازدارندگی بیان LATS۲ در پیشرفت سرطان درگیر است (۲۰-۱۶). نتایج این تحقیق نشان

می‌دهد که شاید بیان بالای miR-۳۷۲ در سرطان معده با تأثیری که بر کاهش LATS۲ دارد، در ایجاد و افزایش ناپایداری‌های ژنومیکی که از ویژگی‌های اساسی سلول‌های سرطان معده است، نقشی محوری دارد. به طور قطعی، این یافته‌ها احتیاج به بررسی‌های بیشتر برای تأیید نتایج در رده‌های سلولی دیگر سرطان معده، مدل‌های آزمایشگاهی و بافت‌های توموری نسبت به بافت سالم اطراف در بیماران سرطان معده دارد.

نتیجه‌گیری نهایی این که یافته‌های پژوهش حاضر در رده‌ی سلولی MKN-۴۵، نشان داد بیان القایی بالای miR-۳۷۲ از طریق ترانسداکشن لنتی ویروس حامل آن، منجر به کاهش بیان LATS۲ می‌گردد. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که در سرطان معده یا حداقل در آدنوکارسینومای معده که این رده‌ی سلولی از آن مشتق شده است، LATS۲ هدف miR-۳۷۲ می‌باشد. کاهش میزان LATS۲ در سلول‌های MKN-۴۵ تیمار شده با لنتی ویروس حامل miR-۳۷۲، باعث افزایش میزان میکرونوکلئی (شاخصی از میزان ناپایداری ژنومیکی در سلول‌ها) گردید. احتمال می‌رود این ناپایداری ژنومیکی با تغییرات بعدی در میزان بیان ژن‌های موجود در این مناطق درگیر در ایجاد میکرونوکلئی و ناهنجاری‌های کروموزومی حین تقسیمات بعدی میتوز، می‌تواند باعث فرایندهای سلولی بعدی گردد که در نهایت با تومورزایی یا تکامل سرطان معده مرتبط هستند. مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری است.

تشکر و قدردانی

انجام این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفته است. بدین وسیله از مقامات محترم این دانشگاه سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58(2): 71-96.
2. Negrini M, Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNAs and cancer--new paradigms in molecular oncology. Curr Opin Cell Biol 2009; 21(3): 470-9.
3. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116(2): 281-97.
4. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(1): 23-36.
5. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. Mol Cell Pharmacol 2011; 3(3): 83-92.
6. Felekkis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. Hippokratia 2010; 14(4): 236-40.
7. Takuno S, Innan H. Evolution of complexity in miRNA-mediated gene regulation systems. Trends Genet 2008; 24(2): 56-9.
8. Di LG, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. Trends Mol Med 2010; 16(6): 257-67.
9. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. Adv Exp Med Biol 2013; 774: 1-20.
10. Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y. Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. PLoS One 2010; 5(9).
11. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006; 6(11): 857-66.
12. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. Int J

Oncol 2009; 34(2): 537-42.
13. Guo J, Miao Y, Xiao B, Huan R, Jiang Z, Meng D, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. J Gastroenterol Hepatol 2009; 24(4): 652-7.
14. Song MY, Pan KF, Su HJ, Zhang L, Ma JL, Li JY, et al. Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. PLoS One 2012; 7(3): e33608.
15. Yin Y, Li J, Chen S, Zhou T, Si J. MicroRNAs as diagnostic biomarkers in gastric cancer. Int J Mol Sci 2012; 13(10): 12544-55.
16. Voorhoeve PM, le SC, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. Cell 2006; 124(6): 1169-81.
17. Cho WJ, Shin JM, Kim JS, Lee MR, Hong KS, Lee JH, et al. miR-372 regulates cell cycle and apoptosis of ags human gastric cancer cell line through direct regulation of LATS2. Mol Cells 2009; 28(6): 521-7.
18. Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, Nishida N, Takahashi H, Haraguchi N, et al. MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. Oncology 2012; 82(4): 205-12.
19. Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY, Chen HW, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. Cancer Cell 2008; 13(1): 48-57.
20. Stelzer Y, Sagi I, Benvenisty N. Involvement of parental imprinting in the antisense regulation of onco-miR-372-373. Nat Commun 2013; 4: 2724.
21. Visser S, Yang X. LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. Cell Cycle 2010; 9(19): 3892-903.
22. (22) Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. Genes Dev 2006; 20(19): 2687-700.
23. Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, et al. Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. J Biol Chem 2007; 282(26): 19259-71.
24. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, et al. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. Nucleic Acids Res 2009; 37(5): 1672-81.
25. Belair C, Baud J, Chabas S, Sharma CM, Vogel J, Staedel C, et al. Helicobacter pylori interferes with an embryonic stem cell micro RNA cluster to block cell cycle progression. Silence 2011; 2(1): 7.
26. Wang Z, Yang Ch. Circulating microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer-opportunities and challenges. Am J Digest Dis 2014;1(1): 44-9.
27. Medina PP, Slack FJ. microRNAs and cancer: an overview. Cell Cycle 2008; 7(16): 2485-92.
28. Liao Y L, Tsai K W, Wen-chang Lin. miRNAs in gastric cancer. In: Lotfy M, editor. Gastric Carcinoma - Molecular Aspects and Current Advances. Rijeka, Croatia: Intech; 2011. p. 85-104.
29. Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. Clin Chem 2009; 55(4): 623-31.
30. Li G, Zhang Z, Tu Y, Jin T, Liang H, Cui G, et al. Correlation of microRNA-372 upregulation with poor prognosis in human glioma. Diagn Pathol 2013; 8: 1.
31. Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, et al. Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(47): 20471-6.
32. Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, et al. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. J Biol Chem 2011; 286(29): 25556-63.
33. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. Stem Cells 2009; 27(5): 1006-20.
34. Golestaneh AF, Atashi A, Langroudi L, Shafiee A, Ghaemi N, Soleimani M. miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. Cell Biochem Funct 2012; 30(5): 411-8.
35. McPherson JP, Tamblyn L, Elia A, Migon E, Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, et al. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. EMBO J 2004; 23(18): 3677-88.
36. Duensing S. A tentative classification of centrosome abnormalities in cancer. Cell Biol Int 2005; 29(5): 352-9.
37. Salisbury JL, Whitehead CM, Lingle WL, Barrett SL. Centrosomes and cancer. Biol Cell 1999; 91(6): 451-60.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 10.09.2014
Vol. 32, No. 311, 4th Week, January 2015
Accepted: 12.12.2014

The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line

Sorayya Ghasemi MSc[1], Hossein Mozdarani PhD[2], Masoud Soleimani PhD[3]

Original Article

Abstract

Background: Gastric cancer is one of the most common cancers in the world and the second leading cause of cancer mortality in humans. MicroRNAs are a group of endogenous RNA, small non-coding nucleotides in length of 21-23. Overexpression of miR-372 acts as an oncomir in various types of cancer via down-regulation of its target, LATS2. Down-regulation of LATS2 leads to the loss of cell cycle regulation, apoptosis inhibition, and increased proliferation rate of the cells.

Methods: In this study, we increased the expression of miR-372 with lentivirus transduction inside the GC cell line MKN-45. After selection of positive cells, miR-372 and LATS2 expression levels were measured through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Cytochalasin B blocked (MN) assay was done to verify the presence or absence of MN for comparing genomic instability in treated cells compared to the controls.

Findings: In the treated cells, compared with the controls, the amount of miR-372 expression significantly increased. Fold changes in 7, 14 and 21 days after the transduction were 7.85, 50.22 and 114.68, respectively ($P = 0.030$). In contrast to the control cells, the fold changes of LATS2 expression in these days were 0.39, 0.29 and 0.15, respectively ($P = 0.016$). In addition, compared with control cells, the genomic instability of treated cells increased significantly ($P < 0.001$).

Conclusion: These results indicate that in MKN-45 cell line, LATS2 is a target of miR-372. LATS2 is down-regulated with increased expression of miR-372. Reduce LATS2, leads to genomic instability during cell division and creates micronuclei and hence may be an important tumor suppressor.

Keywords: Gastric cancer (GC), miR-372, LATS2, Genomic instability

Citation: Ghasemi S, Mozdarani H, Soleimani M. **The Effect of miR-372 on Genome Instability in MKN-45 Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(311): 2035-47

1- PhD Student, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Medical Genetics, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Hematology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Hossein Mozdarani PhD, Email: mozdarah@modares.ac.ir