مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۲۷/هفته‌ی سوم خرداد ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۳

بررسی بیان گیرنده‌ی پولیوویروس (پروتئین CD155) در سطح Messenger RNA (mRNA) و پروتئین در رده‌ی سلولی سرطان کولورکتال

ساره ژند[۱]، سید مسعود حسینی[۲]، علیجان تبرائی[۳]، محسن سعیدی[۴]، عبدالوهاب مرادی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: گیرنده‌ی پولیوویروس (Cluster of differentiation155/Poliovirus receptor یا CD155/PVR) بر روی سطح بسیاری از انواع سلول‌ها بیان می‌شود و فعالیت‌های متنوعی را نشان می‌دهد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تغییرات در بیان CD155 در رده‌های سلولی سرطانی، باعث تحت تأثیر قرار دادن متاستاز، پرولیفراسیون و مهاجرت سلولی می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن و پروتئین CD155 در رده‌ی سلولی سرطانی آدنوکارسینوما کولون در مقایسه با رده‌ی سلولی طبیعی کولون (Fetal human colon یا FHC) می‌باشد.

روش‌ها: میزان بیان CD155 در سطح رونویسی و پروتئین، در رده‌ی سلولی سرطانی آدنوکارسینومای کولون و رده‌ی سلولی طبیعی کولون به عنوان شاهد با استفاده از روش‌های سایبرگرین Real-Time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) و فلوسایتومتری بررسی گردید. آنالیز آماری یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گردید و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج سایبرگرین Real-Time PCR نشان داد که بیان CD155 در سطح رونویسی به طور معنی‌داری در رده‌ی سلولی سرطان کولون نسبت به سلول طبیعی کولون بیشتر می‌باشد ($P < ۰/۰۰۱$). نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که بیان پروتئین CD155 بر روی سطح سلول سرطانی کولون SW480 به میزان ۹۸/۰ درصد و در رده‌ی سلولی طبیعی کولون ۱/۳ درصد بود ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: بیان CD155 در رده‌ی سلولی سرطانی کولون، نسبت به سلول طبیعی کولون افزایش یافت. بر اساس این یافته‌ها، می‌توان پیشنهاد کرد که CD155، می‌تواند به عنوان هدفی مؤثر برای ویروس‌درمانی با به کارگیری پولیوویروس مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پروتئین Cluster of differentiation155، بیان ژن، سرطان کولورکتال، Real-Time polymerase chain reaction، فلوسایتومتری

ارجاع: ژند ساره، حسینی سید مسعود، تبرائی علیجان، سعیدی محسن، مرادی عبدالوهاب. **بررسی بیان گیرنده‌ی پولیوویروس (پروتئین CD155) در سطح Messenger RNA (mRNA) و پروتئین در رده‌ی سلولی سرطان کولورکتال.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۲۷): ۴۶۲-۴۵۳

مقدمه

سرطان کولورکتال، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها درکنار سرطان ریه و پستان در نیم‌کره‌ی غربی می‌باشد (۱). سرطان کولورکتال، سومین سرطان شایع در مردان و دومین مورد در زنان می‌باشد (۲). بروز سرطان کولون در قسمت‌های مختلف دنیا با بیش از ۱۰ برابر موارد بروز متغیر است (۳). بر اساس آمار منتشر شده از سازمان بهداشت جهانی در بانک اطلاعاتی Global cancer، سرطان کولورکتال در کشور ایران، از لحاظ آماری با بروز ۱۱/۰۵، شیوع ۲۶/۳۷ و کشندگی ۶/۶۳، در جایگاه دوم سرطان‌های شایع قرار دارد و میزان بروز و کشندگی این سرطان در ایران در مردان رتبه‌ی چهارم، در زنان رتبه‌ی دوم و در هر دو جنس رتبه‌ی سوم را به خود اختصاص داده است (۴).

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۵- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: عبدالوهاب مرادی
Email: abmoradi@gmail.com

با وجود پیشرفت‌های اساسی که در درمان‌های سرطان ایجاد شده است، میزان مرگ و میر برای بسیاری از بدخیمی‌ها به طور نگران کننده‌ای همچنان بالا باقی مانده است. مهار رشد و پیشرفت سرطان، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های پزشکی می‌باشد (۵). رژیم‌های کلاسیک درمان سرطان (جراحی، هورمون‌درمانی، پرتودرمانی و ایمنی‌درمانی یا درمان بیولوژیکی) اغلب غیر اختصاصی می‌باشند. به بیان دیگر، سمیت درمان نه تنها سلول‌های سرطانی را از بین می‌برد، بلکه سلول‌ها و بافت‌های سالم فرد بیمار نیز آسیب می‌بینند. مشکل بزرگ دیگر در درمان سرطان، ریشه‌کنی ناقص تومور مهاجم اولیه یا انتشار سلول‌های توموری است که منجر به عود بیماری می‌شود. هدف رایج برای توسعه‌ی درمان‌های جدید به منظور درمان سرطان، طراحی عوامل درمانی است که شاخص درمانی زیادی (توانایی بالا در برابر سلول‌های بدخیم با سمیت کم یا بدون سمیت برای سلول‌های طبیعی) داشته باشند (٦). با ظهور ابزارهای جدید بیوتکنولوژی و فهم بهتر بیولوژی سرطان و ویروس‌شناسی، ویروس‌های لایتیک طبیعی به کار گرفته شدند تا سلول‌ها را عفونی نمایند، درون آن‌ها همانندسازی و سلول‌ها را تجزیه کنند (۷). چرخه‌ی همانندسازی بسیاری از ویروس‌ها، مسیرهای سلولی یکسانی را به کار می‌اندازد که در سلول‌های سرطانی تغییر پیدا کرده‌اند (۸). ویروس انکولایتیک، ویروسی است که توانایی اختصاصی برای آلوده کردن و تجزیه‌ی سلول‌های سرطانی را دارد؛ در حالی که به سلول‌های طبیعی آسیبی وارد نمی‌کند (۹). این اختصاصیت، با بهره‌گیری از گیرنده‌ی سطحی سلول مشتق شده است (۱۰).

پولیوویروس، یک انتروویروس متعلق به خانواده‌ی پیکورناویریده (ویروس‌های کوچک، بدون پوشش، بیست وجهی حاوی ژنوم 7.4 Kb RNA) است (۱۱). پولیوویروس، می‌تواند مسیر آپوپتوز را در سلول‌های آلوده به راه اندازد (۱۲). گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی(Cluster of differentiation155/Poliovirus receptor یا CD155/PVR) و همتای میمونی آن، اعضای سوپر خانواده‌ی ایمونوگلوبولین می‌باشند. آن‌ها با خانواده‌ی نکتین از مولکول‌های ادهزین مرتبط هستند که در اتصالات درون سلولی یافت می‌شوند.

نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که PVR/CD155 در بسیاری از سلول‌های سرطانی انسان و طیف وسیعی از رده‌های سلولی تغییر شکل یافته (۱۸-۱۳) بیش از حد بیان می‌شود. بیان تنظیم شده مثبت از CD155 توسط آنالیز ایمونوهیستوشیمی در انواع مختلفی از بافت‌های سرطانی انسان شامل سرطان کولون (۱۹، ۱۷)، گلیومای بدخیم (۲۰، ۱۷)، سرطان پروستات، سرطان سلول‌های کلیوی، کارسینوما پانکراس، سرطان تخمدان، سرطان سلول‌های غیر کوچک ریه و سرطان پستان مشاهده شده است (۱۷). گیرنده‌ی CD155 به همراه اینتگرین avb3 در سلول‌های در حال مهاجرت تجمع می‌نماید و سرم و عامل رشد مشتق از پلاکت (Platelet-derived growth factor یا PDGF) را افزایش می‌دهد و در یک رفتار وابسته به اینتگرین، باعث القای مهاجرت سلول‌ها می‌شود. گیرنده‌ی CD155، همچنین دارای فعالیت ادهزین هتروفیلیک سلول- سلول به طور انتخابی با نکتین ۳ می‌باشد (۲۱، ۱۸). میانکنش CD155 با نکتین ۳، باعث واکنش متقابل E-کادهرین و نکتین ۳ و افزایش چسبندگی سلول- سلول می‌شود (۲۲). این تنظیم منفی اندوسیتوز وابسته به CD155 در سطح تماس سلول- سلول، باعث کاهش حرکت و پرولیفراسیون می‌گردد (۲۳).

مطالعات با استفاده از رده‌های سلولی تغییر شکل یافته یا سرطانی که به طور وسیعی CD155 را بیان می‌کنند، نشان داده است که تنظیم منفی CD155 در این سلول‌ها، مهاجرت (۲٤، ۱۷)، پرولیفراسیون (۲۵) و متاستاز (۲٤) را کاهش می‌دهد. گیرنده‌ی پولیوویروس، یک آنتی‌ژن توموری است. بر اساس تمام شواهد تجربی، CD155 به تنهایی برای اعطا کردن حساسیت سلول‌های پستانداران به پولیوویروس نوع وحشی لازم و ضروری می‌باشد (۲٦). طیف میزبانی پولیوویروس به انسان و پریمات‌های دنیای قدیم محدود می‌شود که مدیون اتکای CD155 اختصاصی گونه است (۲۸-۲۷).

بیان بیش از حد CD155 در تمام آدنوماهایی که دارای ضایعات پیش سرطانی کولورکتال می‌باشند، مشاهده شده است. بیان CD155 ممکن است در مراحل اولیه‌ی تومورزایی نقش داشته باشد و از آن جایی که سطح بیان CD155 در بسیاری از اعضای طبیعی بالغین بسیار پایین است و پروتئین CD155 از طریق وسترن بلاتینگ، شیوه‌نامه‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت غیر مستقیم یا ایمونوپراکسیداز در بافت‌های طبیعی قابل شناسایی نمی‌باشد (۱۸، ۱٤). هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن و پروتئین گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 در یک رده‌ی سلولی سرطانی کولون و یک رده‌ی سلولی طبیعی کولون به عنوان شاهد با استفاده از روش‌های Real-Time PCR و فلوسایتومتری به منظور کاربردهای درمانی بعدی به عنوان هدفی برای ویروس‌درمانی با به کارگیری پولیوویروس بود.

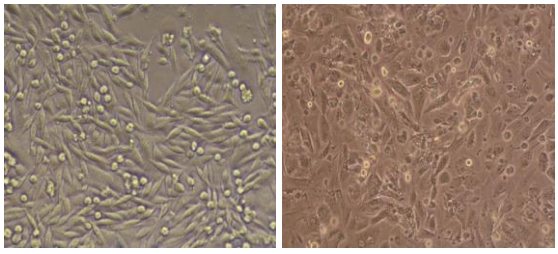
روش‌ها

کشت رده‌ی سلولی سرطانی SW480 و طبیعی کولون (Fetal human colon یا FHC): یک رده‌ی سلولی سرطان کولون با نام SW480 (Pasture NCBI: C506) و یک رده‌ی سلولی طبیعی کولون FHC (ATCC CRL-1831) به عنوان رده‌های سلولی مورد استفاده در این مطالعه انتخاب شدند. این رده‌ی سلولی سرطانی،

به صورت ویال فریز شده از انیستیتو پاستور ایران خریداری و رده‌ی سلولی طبیعی کولون به صورت ویال فریز شده از بانک سلولی آمریکا تهیه گردید. نام این رده‌ی سلولی SW480 متعلق به کولون مرد بیمار ۵۰ ساله مبتلا به سرطان کولون در مراحل ٤-۳، با KRAS نوع G12V و BRAF، PIK3CA و PTEN از نوع wt و TP53 R273H;P309S بود (۲۹).

پس از شمارش سلول و تعیین تعداد سلول‌های زنده‌ی موجود در هر میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی، تعداد $۲-۳ \times ۱۰^{٤}$ سلول زنده به ازای هر سانتی‌متر مربع از فلاسک کشت سلولی، کشت داده شد؛ به طوری که یک ویال حاوی ۱×۱۰^{٦} سلول زنده برای فلاسک T25 مناسب می‌باشد. برای این منظور، به رسوب سلولی به دست آمده پس از سانتریفیوژ، مقدار ۳ میلی‌لیتر محیط کشت استریل حاوی Roswell Park Memorial Institute (RPMI) و Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد و پنی‌سیلین/استرپتومایسین ۱ واحد بر میلی‌لیتر که از قبل در انکوباتور گرم شده بود، اضافه گردید.

بدیهی است که برای کشت رده‌ی سلولی طبیعی کولون، عوامل رشد ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انسولین، ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ترانسفرین، ۱۰ میلی‌مولار HEPES (با فرمول 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid برای غلظت نهایی ۲۵ میلی‌مولار)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر کلراتوکسین و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هیدروکورتیزون، نیز به محیط کشت اضافه گردید. پس از هموژن‌سازی سوسپانسیون سلولی با محیط کشت مورد نظر، سلول در فلاسک T25 کاشته و درون انکوباتور حاوی CO_2 ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. زمان دو برابر شدن برای سلول SW480 و رده‌ی سلولی FHC به ترتیب ۳۸ و ۹۶ ساعت بود. شکل ۱، کشت رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون مورد استفاده در این تحقیق را با بزرگ‌نمایی ٤۰ نشان می‌دهد.



شکل ۱. سمت راست: رده‌ی سلولی SW480، سمت چپ: رده‌ی سلولی طبیعی کولون (Fetal human colon یا FHC) با بزرگ‌نمایی ٤۰

آماده‌سازی سلول‌ها برای سنجش فلوسایتومتری برای نشانگر CD155

به منظور بررسی میزان بیان پروتئین CD155 به عنوان گیرنده‌ی پولیوویروس در سطح سلول سرطانی و طبیعی کولون، از روش سنجش فلوسایتومتری طبق روش زیر استفاده گردید. رده‌ی سلول سرطانی و طبیعی کولون در محیط‌های کشت اختصاصی، کشت داده شدند و پس از آن که این سلول‌ها به جمعیت ۹۰ درصد رسیدند، رده‌های سلولی پیش‌گفته با استفاده از محلول ۰/۲۵ درصد تریپسین- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) تریپسینه و از فلاسک جداسازی شدند. تعداد $۵-۱۰ \times ۱۰^{٦}$ سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت سلولی، برای رنگ‌آمیزی فلوسایتومتری مناسب می‌باشد. از این رو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط کشت سلولی که حاوی $۵-۱۰ \times ۱۰^{٥}$ بود، برای سنجش فلوسایتومتری استفاده گردید. برای این منظور، این سلول‌ها برای مدت ۵ دقیقه با شتاب ۳۰۰۰ دور در دقیقه (Revolutions per minute یا RPM) سانتریفیوژ و با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر Phosphate buffered saline (PBS) شستشو و در دو میکروتیوب جداگانه با حجم ۵۰۰ میکرولیتر تقسیم شدند. یک میکروتیوب برای اضافه کردن آنتی‌بادی مورد نظر و میکروتیوب بعدی برای ایزوتایپ شاهد بود.

برای هر رده‌ی سلولی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر Cell staining buffer با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی anti-human CD155 (PVR) Phycoerythrin (PE) مخلوط کرده و به میکروتیوب مربوط به آنتی‌بادی اضافه گردید و برای مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. برای ایزوتایپ شاهد نیز برای هر رده‌ی سلولی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر Cell staining buffer (eBioScience) با ۵ میکرولیتر از ایزوتایپ شاهد PE Mouse IgG2a, κ (Biolegend) مخلوط گردید و به میکروتیوب مربوط به ایزوتایپ شاهد اضافه گردید و برای مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. آن گاه، تمامی میکروتیوب‌های حاوی آنتی‌بادی و ایزوتایپ شاهد، برای مدت ۵ دقیقه با شتاب ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت حذف گردید. در این مرحله، سلول‌ها دوباره با ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر PBS شستشو داده شدند و برای مدت ۵ دقیقه با شتاب ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت دور ریخته شد. به هر میکروتیوب، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS اضافه گردید و برای سنجش فلوسایتومتری در دستگاه فلوسایتومتر BD Biosciences قرار گرفتند.

تعیین میزان بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس CD155 (PVR) با استفاده از سایبرگرین Real-Time PCR

برای تعیین میزان بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس CD155 (PVR) از تکنیک سایبرگرین Real-Time PCR با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی برای ژن CD155 به عنوان گیرنده‌ی پولیوویروس استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا استخراج RNA رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون با استفاده از محلول ترایزول TRI Reagent sigma-Aldrich catalog number: T9242 طبق شیوه‌نامه‌ی استفاده از آن صورت گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای آمپلیفیکاسیون ژن گیرنده‌ی پولیوویروس (CD155)

نام	توالی پرایمر'3'→5'	ناحیه اتصال	طول محصول PCR
C1پرایمر	TGGACGGCAAGAATGTGACC	۹۴۰-۹۵۹	
C2پرایمر	ATCATAGCCAGAGATGGATACC	۱۰۳۴-۱۰۵۵	۱۱۶ bp
β-actin/F	GTCTGCCTTGGTAGTGGATAATG	۱۲۰-۱۴۲	
β-actin/R	TCGAGGACGCCCTATCATGG	۲۰۳-۲۲۲	۱۲۰ bp

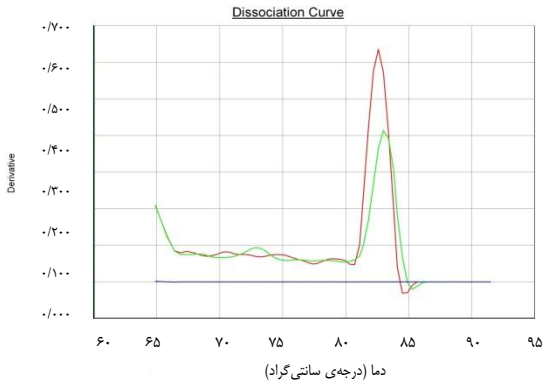
استخراج RNA از رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون: به رسوب سلولی به دست آمده که حاوی $10^6 \times 6$-5 سلول بود، بر طبق شیوه‌نامه، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ترایزول اضافه گردید. میکروتیوب‌ها برای مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند و سپس، به هر یک از میکروتیوب‌ها مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید. میکروتیوب‌ها برای مدت ۱۵ ثانیه به شدت ورتکس گردید و برای مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند. سپس، برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و در دور g× ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در این مرحله، در هر میکروتیوب، سه بخش مشاهده شد. بخش بالایی که به طور کامل شفاف و بی‌رنگ حاوی اسید نوکلئیک بود، بخش میانی که سفید رنگ و حاوی پروتئین بود و بخش زیرین که همان ترایزول بود. در این مرحله، با سمپلر بخش بالایی تا حدود ۳/۱ آن جدا و به میکروتیوب جدید منتقل شد و به آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل سرد اضافه گردید و برای مدت ١٦ ساعت در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور افزایش رسوب RNA انکوبه شد. سپس، تمامی میکروتیوب‌ها برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و در دور g× ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی خالی گردید. در این مرحله، رسوب RNA مشاهده شد و این رسوب با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. برای مدت کوتاهی، نمونه‌ها ورتکس شدند. آن گاه، برای مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و در دور g× ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب RNA برای مدت ۱۰-۵ دقیقه در زیر هود قرار گرفت تا به طور مختصری خشک شود. مقدار ۳۰ میکرولیتر از آب مقطر تیمار شده با Diethyl pyrocarbonate (DEPC) به هر میکروتیوب اضافه گردید و برای مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در ٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور حل شدن رسوب RNA انکوبه شدند. پس از استخراج RNA، آنالیز کمی و کیفی بر روی نمونه‌های استخراج شده صورت گرفت.

هضم آنزیمی DNaseI: و سنتز cDNA بر روی نمونه‌های RNA استخراج شده‌ی رده‌ی سلولی سرطانی و طبیعی کولون: مقدار ٤ میگروگرم از RNA برای هضم آنزیمی DNaseI (Cinnagen) و در نهایت سنتز Complementary DNA (cDNA) مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام سایبرگرین Real-Time PCR لازم است که از روی نسخه‌های RNA استخراج شده‌ی تمام رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون، cDNA سنتز گردد. در این مطالعه، از کیت سنتز cDNA ساخت شرکت ThermoScientific catalog numer :K1621 و بر طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید.

سایبرگرین Real-Time PCR برای ژن گیرنده‌ی پولیوویروس CD155 (PVR): به منظور تعیین میزان بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی (CD155) از روش سایبرگرین Real-Time PCR انجام شد که از پرایمرهای اختصاصی (۳۰) که در جدول ۱ آمده است و به اگزون‌های ۳ و ٤ ژن CD155 انسانی با نواحی مختلف اسپلایسینگ متصل می‌شوند، استفاده گردید. در این مطالعه از ژن β اکتین، به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. Real-Time PCR در ترموسایکلر ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) انجام شد.

مخلوط واکنش شامل Real Q Plus 2x Master Mix Green با غلظت 1x، پرایمر (۱۰ میکرومولار) C1، C2، β-actin/F و β-actin/R با غلظت ۰/٤ میکرومولار بر روی یخ آماده و به طور کامل مخلوط و حجم ۲۲ میکرولیتر آن در داخل میکروتیوب‌های PCR تقسیم گردید. نمونه‌های cDNA که برای رده‌ی سلولی سرطانی و سلول طبیعی کولون با غلظت یکسان و به غلظت ٤ میکروگرم تهیه شده به مقدار ۳ میکرولیتر به هر میکروتیوب دارای مخلوط واکنش اضافه گردید. سپس، با برنامه‌ای شامل ۱۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور فعال‌سازی آنزیم و به دنبال آن برای ٤۰ دوره، به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ به منظور واسرشت الگوی cDNA و ۱ دقیقه در دمای ٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور اتصال و گسترش پرایمر، در ترموسایکلر Real Time ABI7300 قرار داده شدند. منحنی‌های ذوب و تکثیر برای ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 در رده‌ی سلولی SW480 به همراه رده‌ی سلولی طبیعی کولون و نمونه‌ی شاهد منفی در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

آنالیز آماری: ارتباط میان سطح بیان CD155 در رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون با استفاده از آزمون ANOVA دو مرحله‌ای (Post-Hoc) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گردید و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.



شکل ۲. منحنی ذوب رده‌ی سلولی sw480 به همراه رده‌ی سلولی طبیعی کولون و نمونه‌ی شاهد منفی برای ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155

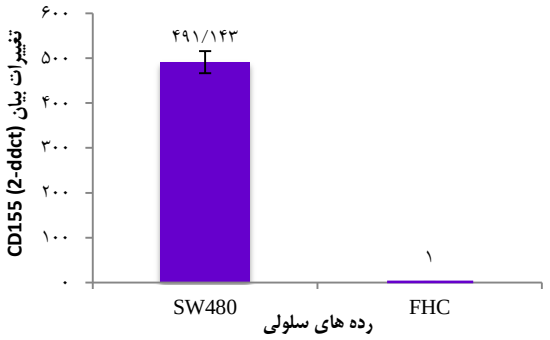
ملاحظات اخلاقی: منبع تأیید کننده‌ی ملاحظات اخلاقی مطالعه‌ی دانشگاه علوم پزشکی گلستان با کد تصویب ۹۳۱۱۲۸۲۵۳ بود.

شکل ۳. منحنی تکثیر رده‌ی سلولی SW480 به همراه رده‌ی سلولی طبیعی کولون و نمونه‌ی شاهد منفی برای ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155

یافته‌ها

ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 در رده‌های سلولی سرطانی کولون بیشتر از رده‌ی سلولی طبیعی بیان می‌شود: بیان ژن CD155 به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) در رده‌ی سلولی سرطان کولون در مقایسه با رده ی سلولی طبیعی بالاتر بود. همان‌طور که در جدول ۲ آمده است، بالاترین میزان بیان ژن CD155 در رده‌ی سلولی SW480 مشاهده گردید و کمترین میزان بیان این ژن، مربوط به رده‌ی سلول طبیعی کولون (FHC) بود. چنانچه در شکل ٤ نشان داده شد، میزان بیان ژن CD155 در رده‌ی سلولی SW480 نسبت به رده‌ی سلولی طبیعی کولون، ٤٩١/١٤ برابر افزایش بیان را نشان داد. تغییرات لگاریتمیک بیان ژن CD155 در رده‌ی سلولی سرطانی و طبیعی کولون نشان داد که میزان بیان Log10 ژن CD155 به طور معنی‌داری در رده‌ی سلولی SW480 در مقایسه با سلول طبیعی کولون بالاتر می‌باشد ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ٥).

پروتئین گیرنده ی پولیوویروس انسانی CD155 در رده‌های سلولی سرطان کولون نسبت به رده‌ی سلولی طبیعی بیشتر بیان می‌شود: به منظور تعیین میزان بیان پروتئین CD155 در رده های سلولی سرطانی و طبیعی کولون، نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری به روش زیر آنالیز گردید. در ابتدا، جمعیت سلول‌های منفرد (Single) بر اساس پراکنش مستقیم و جانبی انتخاب شد (P1) که در سمت چپ شکل ٦ نشان داده شده است. سپس، بعد از حذف کردن رنگ زمینه به کمک ایزوتایپ شاهد که در تصویر میانی آمده است،



شکل ٤. بررسی بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 در مقایسه با ژن مرجع (β اکتین) در رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون

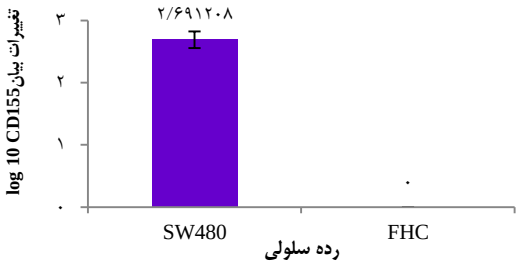
جدول ۲. تغییرات میزان بیان ژن CD155 در رده‌های سلولی سرطانی و طبیعی کولون با استفاده از سایبرگرین Real-Time Polymerase chain reaction (Real-Time PCR)

رده‌های سلولی	بیان ژن طبیعی شده	تغییرات بیان ژن CD155	SD	log10تغییرات بیان
FHC	۱/۳۱	۱	۰	۰
SW480	۶۴۸/۰۶	۴۹۱/۱۴۳۲	۰/۰۵۶۵۶۰۹	۲/۶۹۱۲۰۸

بیان ژن طبیعی شده؛ $2^{-\Delta CT}$ = تغییرات بیان ژن CD155 = $2^{-\Delta\Delta CT}$

SD: Standard deviation; FHC: Fetal human colon

درصد سلول‌های SW480 رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی CD155 در کانال FL2A که در تصویر سمت راست نشان داده شده است، به کمک دستگاه فلوسایتومتر اندازه گیری شد. کانال FL2A به این دلیل استفاده گردید که حداکثر میزان انتشار رنگ PE که برای نشان دار کردن آنتی بادی استفاده شد، در طول موج ۵۷۵ نانومتر بود که با کانال FL2A قابل شناسایی بود.



شکل ۵. تغییر میزان بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 در رده‌ی سلولی سرطانی در مقایسه با سلول طبیعی کولون

FHC: Fetal human colon

میزان بیان پروتئین CD155 با استفاده از فیتواریترین (PE) آنتی‌بادی مونوکلونال ضد انسانی CD155 (PVR) شناسایی گردید و بیان بیش از حد این پروتئین، در رده‌ی سلولی سرطانی کولون مشاهده شد. پروتئین CD155 در رده‌ی سلولی SW480 به میزان ۹۸/۱ درصد بیان شد و این در حالی است که این پروتئین، در رده‌ی سلولی طبیعی کولون، تنها ۱/۳ درصد بیان گردید (شکل‌های ۷-۶).

به طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری و سایبرگرین Real-Time PCR برای بررسی میزان بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 در سطح اسید نوکلئیک و پروتئین، مشخص شد که رده‌ی سلولی سرطانی کولون SW480، بالاترین میزان بیان ژن گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 را به خود اختصاص داده است. همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان بیان گیرنده‌ی پولیوویروس انسانی CD155 به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) در رده‌ی سلولی سرطانی کولون مورد مطالعه، نسبت به رده‌ی سلولی طبیعی کولون بیشتر می‌باشد.

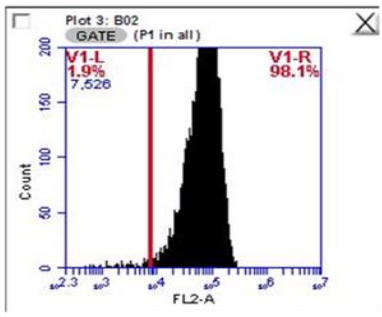
بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیان گیرنده‌ی CD155 هم در سطح پروتئین و هم در سطح اسید نوکلئیک به طور معنی‌داری در سطح سلول سرطانی کولون، نسبت به سلول طبیعی کولون بالاتر می‌باشد.

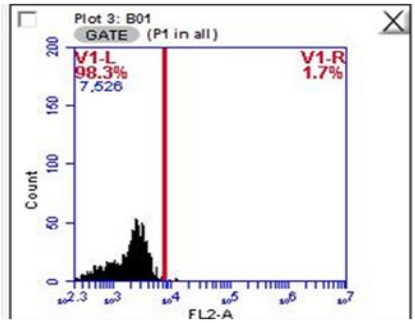
به نظر می‌رسد میزان بیان CD155/PVR در پیشبرد راهبرد ویروس‌درمانی سرطان کولورکتال مؤثر باشد.

Nishiwada و همکاران، بیان ژن CD155 را در ۱۳٤ بیمار مبتلا به سرطان پانکراس بررسی کردند و ارتباط CD155 را با پیش‌بینی ایمنی تومور و آنژیوژنز مورد بررسی قرار دادند و مطابق با نتایج یافته‌های این پروژه نشان دادند که بیان CD155 در بافت‌های سرطان پانکراس بسیار فراوان می‌باشد علاوه بر این، خاموش‌سازی CD155 باعث مهار پرولیفراسیون می‌شود (۳۱). مزیت مطالعه‌ی حاضر، استفاده از سلول طبیعی کلون، به عنوان شاهد و نیز به کارگیری روش نوین اندازه‌گیری میزان بیان پروتئین سطحی CD155 بود.

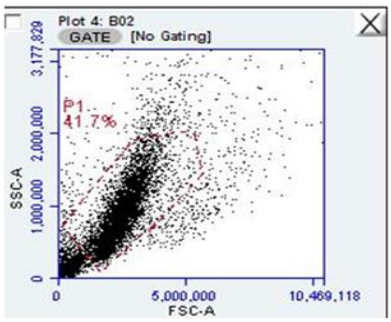
نتایج مطالعات Iguchi-Manaka و همکاران نشان داد که سطح CD155 ترشحی به طور معنی‌داری در سرم ۲٦۲ بیمار با سرطان‌های ریه، گاستروانتستینال، پستان و سرطان‌های زنان در مقایسه با سرم اهدا کنندگان سالم، بالاتر می‌باشد. علاوه بر این، سطح CD155 به طور معنی‌داری در بیماران با مراحل اولیه‌ی بیماری (مراحل ۱ و ۲) سرطان گاستریک نسبت به اهدا کنندگان سالم بالاتر بوده است و در بیماران با مراحل پیشرفته‌ی بیماری (مراحل ۳ و ٤) نسبت به بیماران با مراحل اولیه‌ی بیماری و اهدا کنندگان سالم به طور معنی‌داری بالاتر بوده است.



نمودار هیستوگرام سلول SW480 رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی CD155

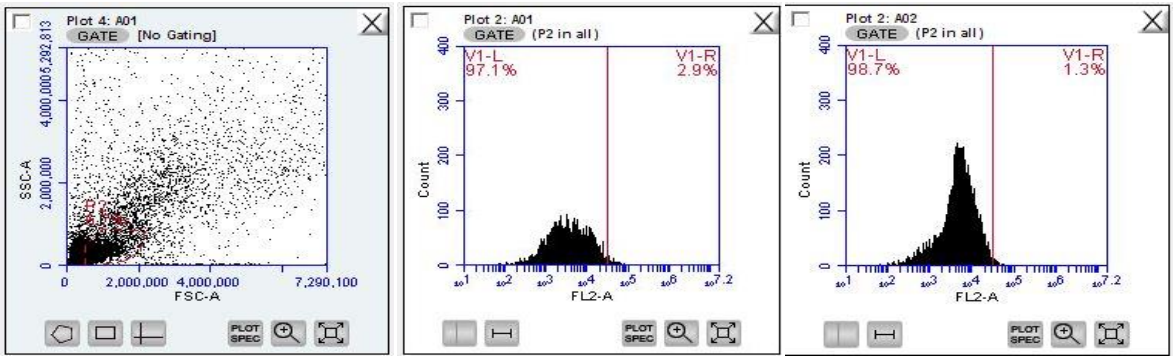


نمودار هیستوگرام سلول SW480 رنگ‌آمیزی شده با ایزوتایپ شاهد



نمودار نقطه‌ای FSC-SSC رده‌ی سلولی SW480

شکل ٦. میزان بیان پروتئین گیرنده‌ی ویروس فلج اطفال انسانی CD155 در رده‌ی سلولی SW480 با استفاده از فلوسایتومتری



نمودار هیستوگرام سلول Fetal human colon (FHC) رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی CD155

نمودار هیستوگرام سلول Fetal human colon (FHC) رنگ‌آمیزی شده با ایزوتایپ شاهد

نمودار نقطه‌ای FSC-SSC رده‌ی سلولی Fetal human colon (FHC)

شکل ۷. میزان بیان پروتئین گیرنده‌ی ویروس فلج اطفال انسانی CD155 در رده‌ی سلولی Fetal human colon (FHC) با استفاده از فلوسایتومتری

علاوه بر این، سطح CD155 ترشحی بعد از جراحی برداشتن سرطان‌ها، به طور معنی‌داری کاهش یافته است. بنابراین، سطح CD155 ترشحی در سرم، ممکن است به صورت بالقوه به عنوان نشانگر زیستی برای پیشرفت سرطان و توسعه‌ی آن مفید باشد (۳۲). اگر چه در مطالعه‌ی حاضر، از رده‌ی سلولی سرطانی و طبیعی کولون به منظور بررسی میزان بیان گیرنده‌ی پولیوویروس CD155 به جای نمونه‌های سرمی استفاده شده است، نتایج مطالعه‌ی Iguchi-Manaka و همکاران (۳۲) با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد؛ به طوری که نشان داده شد که رده‌ی سلولی سرطانی SW480 در ٤ مرحله‌ی بیماری می‌باشد و بالاترین میزان بیان CD155 را هم در سطح پروتئین و هم در سطح اسید نوکلئیک به خود اختصاص داده است.

در مطالعه‌ای Atsumi و همکاران، سطح بیان CD155 را در ٤٣ بیمار با تومور بافت نرم که توسط جراحی برداشته شدند، با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلیمراز کمی مورد ارزیابی قرار دادند. عوامل بالینی پاتولوژیکی که بیان Messenger RNA CD155 (mRNA CD155) را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بررسی شدند و ارتباط میان سطح بیان CD155 و پیش‌بینی بیماری مشخص شد (۳۳). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز هم‌راستا با مطالعه‌ی Atsumi و همکاران، با استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلیمراز کمی و نیز آنالیز فلوسایتومتری، نشان داد که بالاترین میزان بیان CD155 در دو سطح پروتئین و mRNA، در رده‌ی سلولی سرطان کولون مشاهده گردید.

نتایج مطالعه‌ی Nakai و همکاران بر روی ٦٣ بافت آدنوکارسینومای اولیه‌ی ریوی که به منظور بررسی بیان CD155 توسط ایمونوهیستوشیمی مورد مطالعه قرار گرفتند، نشان داده است که بیان بیش از حد CD155 در سلول‌های سرطانی ٤٣ بیمار از ٦٣ بیمار مشاهده شده است و نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز با به کارگیری روش‌های حساس‌تر بیولوژی ملکولی، به یافته‌های مشابهی در ارتباط با سرطان کولون دست پیدا کرد. علاوه بر این، مطالعه‌ی Nakai و همکاران، هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که CD155 با بدخیمی تومور در ارتباط است و بیان بیش از حد CD155 در سلول‌های سرطانی، برای پیش‌بینی ارزیابی بیماران با آدنوکارسینومای اولیه‌ی ریوی، اهمیت بالینی دارد (٣٤).

نتایج مطالعه‌ی Masson و همکاران با استفاده از واکنش نیمه کمی زنجیره‌ی پلیمراز رونوشت‌بردار معکوس Reverse transcription polymerase chain reaction) یا RT-PCR) و آنالیز ایمونوهیستوشیمی بر روی نمونه‌های بافت بیماران با آدنوماها و آدنوکارسینوماهای کولورکتال، هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سطح mRNA CD155 در ٦ بافت از ٦ بافت مورد مطالعه‌ی سرطان کولورکتال، در مقایسه با بافت‌های موکوزی عاری از تومور کولون، افزایش پیدا کرده است. آنالیز ایمونوهیستوشیمی، سطح افزایش یافته‌ی پروتئین CD155 در ١٢ نمونه از ١٢ نمونه را نشان داده است (١٩). لازم به ذکر است که در مطالعه‌ی حاضر، رده‌ی سلولی سرطانی کولون متفاوتی نسبت به رده‌های سلولی استفاده شده در مطالعه‌ی Masson و همکاران (١٩) به کار گرفته شد و همچنین، مزیت مطالعه‌ی حاضر در استفاده از سلول طبیعی کولون، به عنوان شاهد می‌باشد.

نتایج مطالعه‌ی Sloan و همکاران نشان داد که CD155 از طریق ایفای نقش آن در مهاجرت، تعدیل کننده‌ی تهاجم سلول توموری می‌باشد. خاموش کردن CD155، منجر به کاهش معنی‌داری در مهاجرت سلول‌های فیبروسارکوما HT1080 از طریق جاذب‌های شیمیایی سرم شد (١٧). Sloan و همکاران، هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی

حاضر، سطوح بالای بیان پروتئین CD155 در زیر مجموعه‌ای از انواع مختلفی از سلول‌های توموری شامل سرطان‌های پروستات، کلیه، پانکراس، ریه، تخمدان، پستان و مغز را نشان دادند و نقش وسیع‌تری از CD155 را در تومورزایی پیشنهاد کردند (۱۷).

تحقیق بر روی کتابخانه‌ی پایگاه داده‌های SAGE و EST نگهداری شده توسط طرح آناتومی ژنوم سرطان (CGAP به آدرس http://cgap.nci.nih.gov) با استفاده از معرف منحصر به فرد AACCACCCAG از این نظریه که بیان ژن CD155 ممکن است در انواعی از سلول‌های توموری شامل کولون، مغز، کلیه، پانکراس، ریه و شکم افزایش پیدا کند، حمایت کرد (۱۷).

همچنین، Ochiai و همکاران نیز مطابق یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان دادند که بیان CD155 در انواعی از رده‌های سلولی سرطان‌های پستان و تومورهای اولیه‌ی پستان به میزان بالایی تنظیم می‌شود و یک پولیوویروس نوترکیب انکولایتیک که می‌تواند بار سمی را حمل کند، می‌تواند به صورت انتخابی سلول‌های سرطانی پستان را بکشد (۳۵).

نشان داده شده است که پولیوویروس به طور انتخابی سلول‌های حاوی CD155 انسانی را هدف قرار می‌دهد (۲۸-۲۷). همچنین، مطالعات مختلف نشان داده است که پولیوویروس زنده‌ی ضعیف شده، مرگ سلولی آپوپتوتیک را در تومورها شامل گلیوماها (۳۶) و نوروبلاستوماها (۳۷) از طریق میانکنش با CD155 در شرایط in vitro و in vivo القا می‌کند. در گذشته نیز نشان داده شده است که پولیوویروس زنده‌ی ضعیف شده، به عنوان فرمی از انکولایتیک ویروتراپی، برای درمان سارکومای بافت نرم که CD155 را بیان می‌کند، دارای پتانسیل درمانی می‌باشد (۳۸).

انکولایتیک ویروس‌هایی مانند پولیوویروس، سلول‌های توموری را به سرعت از طریق ابزارهای خودش برای کشتن سلول و بدون نیاز به بیان ژن‌های خارجی، تخریب می‌کند. مکانیزم‌های متعدد تجزیه‌ی سلولی وابسته به پولیوویروس به طور کامل شناخته نشده است، اما همراهی توقف سنتز پروتئین سلولی، مهار انتقال گلیکوپروتئین‌های سلولی و هضم پروتئولیتیک عوامل رونوشت‌برداری (۲۰)، منجر به تخریب کامل رده‌های سلولی اولیه می‌شود. پژوهشگران در نظر دارند با استفاده از یافته‌های مطالعه‌ی اخیر و با توجه به مناسب بودن و عدم نیاز به دست‌ورزی ژنی پولیوویروس به عنوان ابزاری برای ویروس‌درمانی سرطان، از این ویروس در تحقیقات بعدی مربوط به ویروس‌درمانی سرطان کولون استفاده نمایند. هر چند که تحقق این هدف نیازمند مطالعات بالینی و Invivo بیشتر و کامل‌تر می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی این که بیان گیرنده‌ی پولیوویروس در هر دو سطح mRNA و پروتئین در رده‌ی سلولی سرطان کولون، نسبت به رده‌ی سلولی طبیعی کولون بالاتر می‌باشد و همچنین، این افزایش بیان با درجه‌ی سرطان کولون، نسبت مستقیم دارد؛ به طوری که بیشترین میزان بیان گیرنده‌ی پولیوویروس در رده‌ی سلولی با پیشرفته‌ترین مرحله‌ی سرطان کولون مشاهده شد و در نتیجه، می‌توان از این یافته، به عنوان ابزار سلولی قدرتمند برای مطالعات ویروس‌درمانی با استفاده از پولیوویروس استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان سپاسگزاری می‌نمایند. همچنین، از زحمات و حمایت‌های سرکار خانم دکتر فرزانه و جناب آقای دکتر نسیمیان از ذخایر ملی ژنتیکی و زیستی ایران و جناب آقای دکتر محمدرضا کلانی و سرکار خانم دکتر ماریه سقاییان، نهایت تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2002. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2002.
2. Macrae FA. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. UpToDate [Online]. [cited 2010]; Available from: URL: http://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 69-90.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015; 136(5): E359-E386.
5. Zhivotovsky B, Orrenius S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. Carcinogenesis 2006; 27(10): 1939-45.
6. Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(7-8): 554-71.
7. Ries SJ, Brandts CH. Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. Drug Discov Today 2004; 9(17): 759-68.
8. Singh PK, Doley J, Kumar GR, Sahoo AP, Tiwari AK. Oncolytic viruses and their specific targeting to tumour cells. Indian J Med Res 2012; 136(4): 571-84.

9. Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs. Trends Pharmacol Sci 2007; 28(7): 326-33.
10. Bell JC, Lichty B, Stojdl D. Getting oncolytic virus therapies off the ground. Cancer Cell 2003; 4(1): 7-11.
11. Blondel B, Duncan G, Couderc T, Delpeyroux F, Pavio N, Colbere-Garapin F. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. J Neurovirol 1998; 4(1): 1-26.
12. Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, et al. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. J Virol 1995; 69(2): 1181-9.
13. Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N, et al. The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. EMBO J 1990; 9(10): 3217-24.
14. Faris RA, McEntire KD, Thompson NL, Hixson DC. Identification and characterization of a rat hepatic oncofetal membrane glycoprotein. Cancer Res 1990; 50(15): 4755-63.
15. Chadeneau C, LeMoullac B, Denis MG. A novel member of the immunoglobulin gene superfamily expressed in rat carcinoma cell lines. J Biol Chem 1994; 269(22): 15601-5.
16. Lim YP, Fowler LC, Hixson DC, Wehbe T, Thompson NL. TuAg.1 is the liver isoform of the rat colon tumor-associated antigen pE4 and a member of the immunoglobulin-like supergene family. Cancer Res 1996; 56(17): 3934-40.
17. Sloan KE, Eustace BK, Stewart JK, Zehetmeier C, Torella C, Simeone M, et al. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. BMC Cancer 2004; 4: 73.
18. Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takekuni K, Satoh K, et al. Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration. J Biol Chem 2003; 278(30): 28167-72.
19. Masson D, Jarry A, Baury B, Blanchardie P, Laboisse C, Lustenberger P, et al. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. Gut 2001; 49(2): 236-40.
20. Gromeier M, Lachmann S, Rosenfeld MR, Gutin PH, Wimmer E. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(12): 6803-8.
21. Mueller S, Wimmer E. Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. J Biol Chem 2003; 278(33): 31251-60.
22. Sato T, Irie K, Ooshio T, Ikeda W, Takai Y. Involvement of heterophilic trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 with nectin-3 in formation of nectin- and cadherin-based adherens junctions. Genes Cells 2004; 9(9): 791-9.
23. Fujito T, Ikeda W, Kakunaga S, Minami Y, Kajita M, Sakamoto Y, et al. Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3. J Cell Biol 2005; 171(1): 165-73.
24. Ikeda W, Kakunaga S, Takekuni K, Shingai T, Satoh K, Morimoto K, et al. Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, Nectin-3-independent manner. J Biol Chem 2004; 279(17): 18015-25.
25. Kakunaga S, Ikeda W, Shingai T, Fujito T, Yamada A, Minami Y, et al. Enhancement of serum- and platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by Necl-5/Tage4/poliovirus receptor/CD155 through the Ras-Raf-MEK-ERK signaling. J Biol Chem 2004; 279(35): 36419-25.
26. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell 1989; 56(5): 855-65.
27. Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, Racaniello VR. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. Cell 1990; 63(2): 353-62.
28. Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, et al. Transgenic mice susceptible to poliovirus. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88(3): 951-5.
29. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis 2013; 2: e71.
30. Baury B, Masson D, McDermott BM, Jr., Jarry A, Blottiere HM, Blanchardie P, et al. Identification of secreted CD155 isoforms. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309(1): 175-82.
31. Nishiwada S, Sho M, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, et al. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. Anticancer Res 2015; 35(4): 2287-97.
32. Iguchi-Manaka A, Okumura G, Kojima H, Cho Y, Hirochika R, Bando H, et al. Increased soluble CD155 in the serum of cancer patients. PLoS One 2016; 11(4): e0152982.
33. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Sudo A. Prognostic significance of CD155 mRNA expression in soft tissue sarcomas. Oncol Lett 2013; 5(6): 1771-6.
34. Nakai R, Maniwa Y, Tanaka Y, Nishio W, Yoshimura M, Okita Y, et al. Overexpression of Necl-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Cancer Sci 2010; 101(5): 1326-30.
35. Ochiai H, Moore SA, Archer GE, Okamura T, Chewning TA, Marks JR, et al. Treatment of intracerebral neoplasia and neoplastic meningitis with regional delivery of oncolytic recombinant poliovirus. Clin Cancer Res 2004; 10(14): 4831-8.
36. Merrill MK, Bernhardt G, Sampson JH, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gromeier M. Poliovirus receptor CD155-targeted oncolysis of glioma. Neuro Oncol 2004; 6(3): 208-17.
37. Toyoda H, Ido M, Hayashi T, Gabazza EC, Suzuki K, Kisenge RR, et al. Experimental treatment of human neuroblastoma using live-attenuated poliovirus. Int J Oncol 2004; 24(1): 49-58.
38. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Nakamura T, et al. Oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas using live attenuated poliovirus. Int J Oncol 2012; 41(3): 893-902.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 02.05.2017
Vol. 35, No. 427, 3rd Week, June 2017
Accepted: 24.05.2017

Study of the Transcript and Protein Expression of Poliovirus Receptor (CD155 Protein) on Colorectal Cancer Cell Line

Sareh Zhand[1], Seyed Masoud Hoseini[2], Alijan Tabarraei[3], Mohsen Saeedi[4], Abdovahab Moradi[5]

Original Article

Abstract

Background: Poliovirus receptor (CD155 protein or PVR) expressed on many types of cells and exerts diverse functions. Several studies have demonstrated that changes in CD155 expression in cancer cell lines affect metastasis, proliferation, and migration. The purpose of the present study was to investigate the transcript and protein expression of CD155 in human colon adenocarcinoma cell lines in comparison to normal fetal human colon (FHC) cells.

Methods: The CD155 expression levels in a human adenocarcinoma cell line and normal colon cell line were evaluated using the quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry. All statistical analyses were performed using SPSS software at the statistical significance level of $P < 0.050$.

Findings: Real-time polymerase chain reaction indicated that CD155 significantly overexpressed in human adenocarcinoma cell line significantly more than normal fetal cells ($P < 0.001$). Flow cytometry showed that protein was strongly expressed in cancer cell line and SW480 cell line showed the highest CD155 protein expression level of 98.0%, whereas this protein expression was 1.3% in human normal colon cell line ($P < 0.001$).

Conclusion: Collectively, these data indicate that CD155 expression is frequently elevated in cancer cell line. The preferential expression of CD155 on cancer cell line rather than on normal cell line suggests that CD155 could be targeted for future poliovirus virotherapy.

Keywords: CD155 protein, Gene expression, Colorectal cancer, Real-Time polymerase chain reaction, Flow cytometry

Citation: Zhand S, Hoseini SM, Tabarraei A, Saeedi M, Moradi A. **Study of the Transcript and Protein Expression of Poliovirus Receptor (CD155 Protein) on Colorectal Cancer Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(427): 453-62.

1- PhD Candidate , Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
4- Assistant Professor, Stem Cell Research Center AND Department of Immunology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
5- Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
Corresponding Author: Abdovahab Moradi, Email: abmoradi@gmail.com