

بررسی بیان miR-125b و ژن‌های ضد آپوپتوز MCL-1 و BCL-2 به دنبال تیمار با والپروئیک اسید در رده‌های سلولی سرطان پستان

نسترن اینجیناری^۱، زینب امینی فارسانی^۲، حسین تیموری^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: یکی از علل مرگ و میر ناشی از سرطان پستان، مقاومت دارویی و فعالیت ضد آپوپتوزی سلول‌های سرطانی است. عوامل اپی‌ژنتیک در هر دوی این فرایندها نقش دارند. Micro RNA (miRNA)ها عوامل اپی‌ژنتیک هستند که بیان نابه‌جای آن‌ها سرطان را شتاب می‌بخشند. والپروئیک اسید، یک داروی مهار کننده‌ی هیستون داستیلاز است که عملکرد ضد سرطانی دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر والپروئیک اسید بر بیان miR-125b به عنوان یکی از miRNAهای سرکوب کننده‌ی تومور در سرطان پستان و بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی B-cell lymphoma 2 (BCL-2) و Myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) به عنوان اهداف احتمالی miR-125b در رده‌های سلولی MDA-MB-231 و Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ابتدا رده‌های سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 در شرایط بهینه کشت داده شدند. زیستایی سلول‌ها در غلظت‌های متفاوت والپروئیک اسید و زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT اندازه‌گیری شد. بیان miR-125b و ژن‌های BCL-2 و MCL-1 با روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA واکاوی شدند.

یافته‌ها: والپروئیک اسید با افزایش دز و زمان، به طور معنی‌داری منجر به کاهش زیست‌پذیری هر دو رده‌ی سلولی می‌شود. همچنین، والپروئیک اسید منجر به افزایش معنی‌دار miR-125b در هر دو رده‌ی سلولی می‌گردد ($P < 0/010$). در سلول‌های MCF-7، این دارو منجر به کاهش معنی‌دار ژن‌های BCL-2 و MCL-1 می‌شود ($P < 0/001$)، اما تفاوت در بیان این دو ژن در سلول‌های تیمار شده‌ی MDA-MB-231 نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0/050$).

نتیجه‌گیری: احتمال می‌رود والپروئیک اسید از طریق مداخله در فرایندهای اپی‌ژنتیکی و با تأثیر بر بیان ژن‌های BCL-2 و MCL-1 می‌تواند به عنوان گزینه‌ی مناسب در تحقیقات سرطان پیشنهاد شود.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، سرطان پستان، Micro RNA، والپروئیک اسید

ارجاع: اینجیناری نسترن، امینی فارسانی زینب، تیموری حسین. بررسی بیان miR-125b و ژن‌های ضد آپوپتوز MCL-1 و BCL-2 به دنبال تیمار با والپروئیک اسید در رده‌های سلولی سرطان پستان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۴۲): ۱۰۶۷-۱۰۶۱

Micro RNA (miRNA)ها، گروهی از RNAهای غیر کد کننده هستند که از طریق انتهای ۵' خود با ۳' غیر قابل ترجمه‌ی Messenger RNA (mRNA) (3'-UTR) هدف، پیوند هیدروژنی برقرار می‌نمایند و از این طریق، بیان ژن‌ها را پس از رونویسی به صورت کاهش تنظیم می‌کنند (۵). امروزه، ثابت شده است که بیان تنظیم نشده‌ی برخی از miRNAها با دخالت در تکثیر سلول‌ها، رگ‌زایی، متاستاز و آپوپتوز در انواع مختلف سرطان، بسته به عملکرد

مقدمه

سرطان پستان، به عنوان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان (۱) به داروهای شیمیایی مقاومت نشان می‌دهد (۲). مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی نظیر تغییرات هیستون‌ها و RNAهای غیر کد کننده، در مقاومت دارویی مؤثر هستند (۳). آنزیم‌های هیستون داستیلاز، با حذف گروه استیل از هیستون‌ها، منجر به خاموشی ژن می‌شوند که افزایش بیان این آنزیم‌ها، باعث خاموشی ژن‌های سرکوب کننده‌ی تومور می‌شود (۴).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد، پژوهشگاه پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد، پژوهشگاه پایه‌ی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: حسین تیموری

Email: hteimori@skums.ac.ir

ژن هدف آن‌ها، به عنوان سرکوب کننده‌ی تومور یا آنکومیر عمل می‌کنند (۶). همچون بسیاری از miRNAهای دخیل در سرطان‌ها، miR-125b نیز در این رابطه به صورت دوگانه عمل می‌کند. miR-125b در تعدادی از سرطان‌ها مانند سرطان پروستات و پانکراس، به عنوان آنکومیر و در تعدادی از سرطان‌ها نظیر سرطان پستان، تخمدان و ملانوما، به عنوان سرکوبگر تومور عمل می‌کند و با هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز، باعث تحریک آپوپتوز و مهار تکثیر سلولی در این دسته از تومورها می‌شود (۷).

بر هم خوردن تعادل میان پروتئین‌های اعضای خانواده‌ی B-cell lymphoma 2 (BCL-2)، نقش اساسی در شروع و پیشرفت سرطان دارد (۸). مطالعات نشان داده‌اند BCL-2 و Myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) که دو عضو از ژن‌های ضد آپوپتوزی خانواده‌ی BCL-2 هستند، در سرطان پستان افزایش بیان پیدا می‌کنند. افزایش بیان این دو ژن با پیش‌آگهی ضعیف بیماران مبتلا به سرطان پستان مرتبط است (۹-۱۱). به همین دلیل، امروزه توجه دانشمندان به استفاده از داروهایی جلب شده است که منجر به مهار بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی اعضای خانواده‌ی BCL-2 می‌شوند. یکی از رویکردهای شناسایی داروهای مؤثر در درمان سرطان‌ها، استفاده از داروهای ساخته شده‌ای است که در گذشته برای درمان بیماری‌هایی غیر از سرطان، تأیید شده‌اند و مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله‌ی این داروها، می‌توان به داروی والپروتیک اسید (VPA) اشاره کرد. والپروتیک اسید $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHCO}_2\text{H}$ نوعی اسید چرب با زنجیره‌ی کوتاه است که برای بهبود صرع، بیماری‌های دو قطبی، میگرن و اسکیزوفرنی استفاده می‌شود (۱۲). امروزه، مشخص شده است که والپروتیک اسید، می‌تواند به عنوان یک مهار کننده‌ی هیستون داستیلازها با بسیاری از فرایندهای سلول‌های سرطانی همچون تکثیر سلول، فرار از آپوپتوز و مهاجرت سلول‌ها مداخله کند (۱۳-۱۴).

از آن جایی که داروهای مهاجم نسبت به مکانیسم‌های ژنتیکی، بسیار مؤثر و در حال عمومی شدن هستند، هدف از انجام این مطالعه، ابتدا بررسی درصد زیستایی والپروتیک اسید در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 در نظر گرفته شد. پس از آن، بیان miR-125b و BCL-2 و MCL-1 یعنی miRNA هدف این مطالعه بررسی شد.

۱۰۰ × میزان جذب نوری کنترل/میزان جذب نوری تیمار = درصد زیستایی

Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR):

پس از تیمار سلول‌های مورد مطالعه با غلظت ۱۰ میلی‌مولار از والپروتیک اسید به مدت ۴۸ ساعت، استخراج RNA تام به صورت جداگانه برای هر کدام از گروه سلول‌ها به کمک محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب روی ژل آگارز ۱ درصد و

بر هم خوردن تعادل میان پروتئین‌های اعضای خانواده‌ی B-cell lymphoma 2 (BCL-2)، نقش اساسی در شروع و پیشرفت سرطان دارد (۸). مطالعات نشان داده‌اند BCL-2 و Myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) که دو عضو از ژن‌های ضد آپوپتوزی خانواده‌ی BCL-2 هستند، در سرطان پستان افزایش بیان پیدا می‌کنند. افزایش بیان این دو ژن با پیش‌آگهی ضعیف بیماران مبتلا به سرطان پستان مرتبط است (۹-۱۱). به همین دلیل، امروزه توجه دانشمندان به استفاده از داروهایی جلب شده است که منجر به مهار بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی اعضای خانواده‌ی BCL-2 می‌شوند. یکی از رویکردهای شناسایی داروهای مؤثر در درمان سرطان‌ها، استفاده از داروهای ساخته شده‌ای است که در گذشته برای درمان بیماری‌هایی غیر از سرطان، تأیید شده‌اند و مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله‌ی این داروها، می‌توان به داروی والپروتیک اسید (VPA) اشاره کرد. والپروتیک اسید $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CHCO}_2\text{H}$ نوعی اسید چرب با زنجیره‌ی کوتاه است که برای بهبود صرع، بیماری‌های دو قطبی، میگرن و اسکیزوفرنی استفاده می‌شود (۱۲). امروزه، مشخص شده است که والپروتیک اسید، می‌تواند به عنوان یک مهار کننده‌ی هیستون داستیلازها با بسیاری از فرایندهای سلول‌های سرطانی همچون تکثیر سلول، فرار از آپوپتوز و مهاجرت سلول‌ها مداخله کند (۱۳-۱۴).

از آن جایی که داروهای مهاجم نسبت به مکانیسم‌های ژنتیکی، بسیار مؤثر و در حال عمومی شدن هستند، هدف از انجام این مطالعه، ابتدا بررسی درصد زیستایی والپروتیک اسید در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 در نظر گرفته شد. پس از آن، بیان miR-125b و BCL-2 و MCL-1 یعنی miRNA هدف این مطالعه بررسی شد.

از آن جایی که داروهای مهاجم نسبت به مکانیسم‌های ژنتیکی، بسیار مؤثر و در حال عمومی شدن هستند، هدف از انجام این مطالعه، ابتدا بررسی درصد زیستایی والپروتیک اسید در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 در نظر گرفته شد. پس از آن، بیان miR-125b و BCL-2 و MCL-1 یعنی miRNA هدف این مطالعه بررسی شد.

روش‌ها

کشت سلول: در این مطالعه‌ی تجربی، ابتدا رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute-1640

(GAPDH) و (SNORD) Small nucleolar RNAs C/D box) به ترتیب به عنوان شاهد داخلی ژن‌ها و miRNA مورد مطالعه در نظر گرفته شدند. توالی پرایمرهای GAPDH، BCL-2 و MCL-1 به ترتیب با استناد به مقالات معتبر انتخاب شدند (۱۶-۱۸). پس از (Primer blast) (BLAST) basic local alignment search tool توالی پرایمرها در پایگاه داده‌ی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و اطمینان از صحت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر، مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، برای بررسی میزان بیان miRNA هدف، از پرایمرهای شرکت بن‌یاخته استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش در جدول ۱ آمده است.

واکاوی آماری: تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و آزمون‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 5.01 انجام شد (GraphPad, USA). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارایه شدند. اطلاعات به دست آمده از Real-time PCR با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در نرم‌افزار Excel نسخه‌ی ۲۰۱۶ واکاوی شدند. اطلاعات بیان ژن حاصل از Real-time PCR با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت سلول و MTT: نتایج آزمایش MTT نشان داد که والپروتیک اسید درصد زیستایی را در هر دو رده‌ی سلولی متناسب با افزایش غلظت و زمان کاهش می‌دهد. میانگین IC30 برای هر دو رده‌ی سلولی، ۱۰ میلی‌مولار به دست آمد ($P < 0/05$) (شکل ۱).

Real-time PCR: بررسی اثر داروی والپروتیک اسید بر بیان miR-125b در سلول‌های هدف نشان داد VPA به صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان ۱۱/۳۵ برابری و ۷/۵۲ برابری miR-125b به ترتیب در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 نسبت به گروه شاهد شده است ($P < 0/05$) (شکل ۲).

دستگاه نانودراپ بررسی شد. سپس، نمونه‌های RNA در دمای -70°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنتز complementary DNA (cDNA) به طور جداگانه برای بررسی بیان ژن‌ها و miRNA مورد نظر به ترتیب با استفاده از کیت‌های یکتاتجهیز (شماره‌ی کاتالوگ: YT4500) و بن‌یاخته (شماره‌ی کاتالوگ: BON209001) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ساخت cDNA برای ژن‌های مورد نظر در برنامه‌ی حرارتی ۵ دقیقه در دمای 25°C درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای 42°C درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای 72°C درجه‌ی سانتی‌گراد و برای miRNA مورد نظر در برنامه‌ی حرارتی ۱۰ دقیقه در دمای 25°C درجه‌ی سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای 42°C درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای 72°C درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. Real-time PCR برای ژن‌ها و miRNA مورد مطالعه به ترتیب با استفاده از کیت یکتاتجهیز و بن‌یاخته طبق شیوه‌نامه‌ی آن انجام شد. برنامه‌ی حرارتی برای ژن‌ها در ۴ مرحله شامل مرحله‌ی فعال‌سازی اولیه (Hold) به مدت ۱۲۰ ثانیه در دمای 95°C درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی واسرشتگی به مدت ۲۰ ثانیه در دمای 95°C درجه‌ی سانتی‌گراد، مرحله‌ی اتصال پرایمرها به مدت ۲۰ ثانیه در دمای 60°C درجه‌ی سانتی‌گراد و مرحله‌ی طولیل‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای 72°C درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد و تعداد کل چرخه‌ها ۴۰ چرخه در نظر گرفته شد.

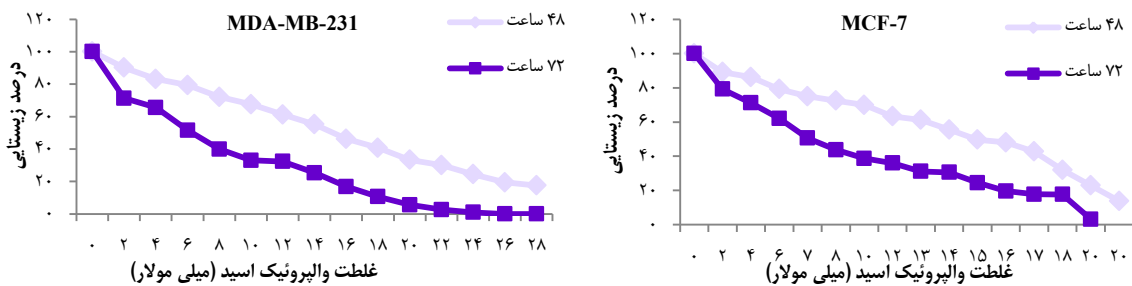
برای miRNA مورد مطالعه، چرخه‌های دمایی شامل یک چرخه‌ی فعال‌سازی اولیه در دمای 95°C درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل مرحله‌ی دناتوراسیون به مدت ۵ ثانیه در 95°C درجه‌ی سانتی‌گراد و مرحله‌ی ترکیبی اتصال پرایمر و پلیمریزاسیون به مدت ۲۰ ثانیه در دمای 60°C درجه‌ی سانتی‌گراد بود.

بررسی منحنی ذوب برای تأیید این که «آیا همه‌ی محصولات پرایمرها دارای یک آپلیکون در فرایند PCR هستند؟»، استفاده شد. نتایج به دست آمده با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد واکاوی قرار گرفتند. در این آزمایش، Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای واکنش

(Real-time PCR) Real-time polymerase chain reaction

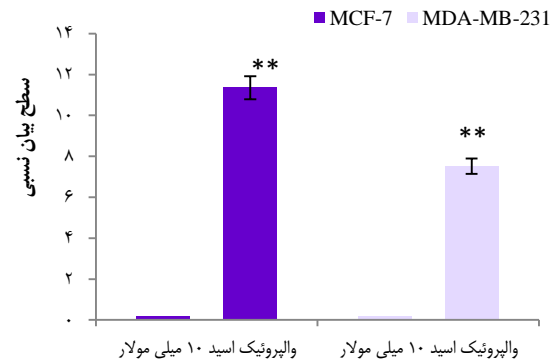
مدت زمان (ثانیه)	توالی	عنوان پرایمر
۶۰	5 ACGGATTTGGTTCGTATTGGG 3	GAPDH Forward
۶۰	5 TGATTTTGGAGGGGATCTCGC 3	GAPDH Reverse
۶۰	5 GCTCTAAAATCCATCCAG 3	BCL-2 Forward
۶۰	5 CCTCTCCATCATCAACTT 3	BCL-2 Reverse
۶۰	5 GGGCAGGATTGTGACTCTCATT 3	MCL-1 Forward
۶۰	5 GATGCAGCTTTCTTGGTTTATGG 3	MCL-1 Reverse



شکل ۱. درصد زیستایی در سلول‌های Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) و MDA-MB-231

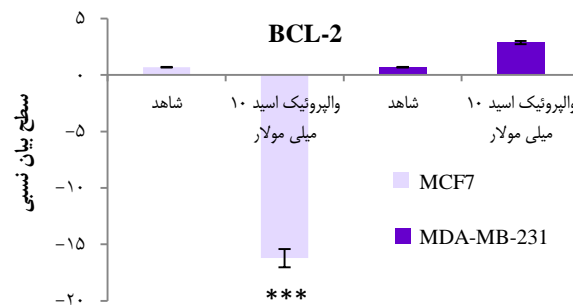
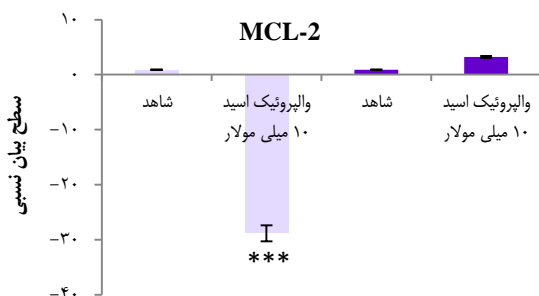
نتایج MTT نشان داد که والپروئیک اسید، سبب کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها در حالت وابسته به غلظت و زمان می‌شود.

همچنین، بررسی اثر والپروئیک اسید بر سطح بیان دو مورد از مهم‌ترین ژن‌های هدف احتمالی miRNA مورد مطالعه در مسیر آپوپتوز نشان داد، والپروئیک اسید منجر به کاهش ۱۶/۲۲ برابری و ۲۸/۸۴ برابری بیان ژن‌های BCL-2 و MCL-1 نسبت به گروه شاهد در سلول‌های MCF-7 شد. در سلول‌های MDA-MB-231، والپروئیک اسید منجر به افزایش بیان ژن‌های BCL-2 و MCL-1 به ترتیب به میزان ۲/۸۷ برابر و ۳/۲۳ برابر نسبت به گروه شاهد گردید، اما این افزایش از نظر آماری برای هیچ کدام از ژن‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۳).



شکل ۲. تأثیر والپروئیک اسید بر بیان miR-125b در رده‌های سلولی Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) و MDA-MB-231

تیمار سلول‌های مورد مطالعه با غلظت ۱۰ میلی‌مولار از داروی والپروئیک اسید به مدت ۴۸ ساعت، منجر به افزایش بیان miR-125b در هر دو رده‌ی سلولی شده است. Small nucleolar RNAs C/D box (SNORD) به عنوان شاهد داخلی در نظر گرفته شده است. همچنین، مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار آمده است و علامت * نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن تفاوت در گروه مورد نسبت به گروه شاهد است ($P < 0.01$).



شکل ۳. تأثیر والپروئیک اسید بر بیان Myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) و B-cell lymphoma 2 (BCL-2) در رده‌های سلولی Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) و MDA-MB-231

تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۰ میلی‌مولار از داروی والپروئیک اسید به مدت ۴۸ ساعت منجر به کاهش بیان ژن‌های ضد آپوپتوز BCL-2 و MCL-1 در سلول‌های MCF-7 شده است. میزان بیان این ژن‌های ضد آپوپتوزی در سلول‌های MDA-MB-231 تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان شاهد داخلی در نظر گرفته شد و مقادیر با استفاده از آزمون One-way ANOVA واکاوی شدند. علامت * نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن تفاوت گروه مورد نسبت به گروه شاهد است ($P < 0.001$).

Gilardini Montani و همکاران دریافتند والپروئیک اسید منجر به کاهش سطح پروتئین MCL-1 در سلول‌های PaCa44 و Panc1 مربوط به سرطان پانکراس می‌شود (۲۴). نتایج مطالعه‌ی حاضر در سطح بیان ژن نشان داد والپروئیک اسید منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های ضد آپوپتوز BCL-2 و MCL-1 در سلول‌های MCF-7 نسبت به گروه شاهد می‌شود، اما تفاوت معنی‌داری در بیان این دو ژن در سلول‌های MDA-MB-231 نسبت به گروه شاهد وجود نداشت. تأثیر یک داروی واحد بسته به نوع سلول‌های سرطانی می‌تواند متفاوت باشد (۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد والپروئیک اسید منجر به تغییر بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی پیش‌گفته در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 می‌شود. با توجه به این که رده‌ی سلولی MCF-7 جزء لومینال A (ER+, PR+, HER2-) و رده‌ی سلولی MDA-MB-231 جزء رده‌ی سلولی سه‌گانه‌ی منفی (ER-, PR-, HER2-) است، در نتیجه، حساسیت این دو رده‌ی سلولی به داروهای مختلف نظیر والپروئیک اسید متفاوت است. بنابراین، حتی در یک نوع خاص سرطان، شناسایی بهترین دارو برای هر بیمار سرطانی به یک راهبرد شخصی شده‌ی کارآمد نیاز دارد که این مطلب، اهمیت پیش‌بینی ژنومی هر فرد مبتلا به سرطان و پزشکی شخصی را برجسته می‌کند (۲۶-۲۵).

امروزه، مطالعات زیادی به بررسی ویژگی‌های ضد سرطانی والپروئیک اسید پرداخته‌اند، اما نتایج تعدادی از این مطالعات با یکدیگر ضد و نقیض می‌باشند. از نتایج مطالعه‌ی حاضر چنین استنباط می‌شود که احتمال دارد والپروئیک اسید از طریق تأثیر بر بیان ژن‌های اعضای خانواده‌ی BCL-2 و از طریق مداخله در فرایندهای اپی‌ژنتیک، می‌تواند به عنوان گزینه‌ی مناسب در تحقیقات سرطان پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی مصوب در مرکز تحقیقاتی سلولی و مولکولی شهرکرد به شماره‌ی ۲۹۰۴ و با کد اخلاق IR.SKUMS.REC.1397.234 می‌باشد. از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به خاطر حمایت مالی این طرح، تقدیر و تشکر می‌شود.

تاکنون گزارش‌های متعددی نشان دادند که والپروئیک اسید منجر به القای آپوپتوز در انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۹-۱۸، ۱۴)، اما مکانیسم‌های مولکولی والپروئیک اسید که منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود، هنوز به طور واضح مشخص نیست. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد والپروئیک اسید منجر به کاهش زیست‌پذیری هر دو رده‌ی سلولی با افزایش غلظت و زمان می‌شود. همچنین، این دارو، باعث افزایش معنی‌دار miR-125b در هر دو رده‌ی سلولی نسبت به گروه شاهد و کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های ضد آپوپتوز BCL-2 و MCL-1 نسبت به گروه شاهد در سلول‌های MCF-7 می‌شود، اما تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن‌های BCL-2 و MCL-1 در سلول‌های MDA-MB-231 نسبت به گروه شاهد وجود نداشت.

در مطالعه‌ی Willimott و Wagner، مشخص شد که miR-125b با هدف قرار دادن ۳۱ غیر قابل ترجمه‌ی mRNA مربوط به BCL-2 منجر به آپوپتوز سلول‌های سرطانی MEC1 می‌شود (۲۰). Lin و همکاران گزارش کردند، بیان miR-125b در سلول‌های سرطانی پانکراس که با داروی والپروئیک اسید تیمار شده بودند، افزایش می‌یابد (۲۱). مطالعه‌ی حاضر نشان داد والپروئیک اسید، باعث افزایش معنی‌دار بیان miR-125b در رده‌های سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 در مقایسه با گروه شاهد می‌شود.

انتظار می‌رود که استفاده از داروهای به منظور برگرداندن تعادل میان اعضای خانواده‌ی BCL-2 که منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شوند، مانند مکانیسم‌هایی که منجر به تغییر بیان ژن یا تغییر فعالیت پروتئین‌ها می‌شوند، در آینده‌ای نه چندان دور در بالین استفاده شود. BCL-2 و MCL-1، دو ژن ضد آپوپتوزی هستند که در سرطان پستان افزایش بیان دارند و با خطر عود مجدد و مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی مرتبط هستند. در ۷۰ درصد از سرطان‌های پستان، BCL-2 افزایش بیان دارد؛ به طوری که افزایش بیان BCL-2 مؤلفه‌ای از آزمایش انکو تایپ DX است که برای پیش‌بینی خطر عود مجدد در بیماران Estrogen receptor-positive (ER+) استفاده می‌شود (۲۲، ۱۱).

همچنین، Young و همکاران گزارش کردند که در ۳۰ درصد از موارد سرطان پستان تکثیر ژن MCL-1 اتفاق می‌افتد (۲۳).

References

1. Pasculli B, Barbano R, Parrella P. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin Cancer Biol* 2018; 51: 22-35.
2. Zhou X, Li Z, Wang X, Jiang G, Shan C, Liu S. Metabolomics reveals the effect of valproic acid on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Xenobiotica* 2019; 1-9. . [Epub ahead of print].
3. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 2014; 9(1): 3-12.
4. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors

- and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(1): 38-51.
5. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett* 2009; 285(2): 116-26.
 6. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med* 2006; 79(3-4): 131-40.
 7. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 6.
 8. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 263-70.
 9. Campbell KJ, Dhayade S, Ferrari N, Sims AH, Johnson E, Mason SM, et al. MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 19.
 10. Hird AW, Tron AE. Recent advances in the development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2019; 198: 59-67.
 11. Zarella MD, Heintzelman RC, Popnikolov NK, Garcia FU. BCL-2 expression aids in the immunohistochemical prediction of the Oncotype DX breast cancer recurrence score. *BMC Clin Pathol* 2018; 18: 14.
 12. Sajadpoor Z, Amini-Farsani Z, Teimori H, Shamsara M, Sangtarash MH, Ghasemi-Dehkordi P, et al. Valproic acid promotes apoptosis and cisplatin sensitivity through downregulation of H19 noncoding RNA in ovarian A2780 cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2018; 185(4): 1132-44.
 13. Terranova-Barberio M, Roca MS, Zotti AI, Leone A, Bruzzese F, Vitagliano C, et al. Valproic acid potentiates the anticancer activity of capecitabine in vitro and in vivo in breast cancer models via induction of thymidine phosphorylase expression. *Oncotarget* 2016; 7(7): 7715-31.
 14. Aztopal N, Erkisa M, Erturk E, Ulukaya E, Tokullugil AH, Ari F. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chem Biol Interact* 2018; 280: 51-8.
 15. Paik WH, Ryu JK, Jeong KS, Park JM, Song BJ, Lee SH, et al. Clobenpropit enhances anti-tumor effect of gemcitabine in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(26): 8545-57.
 16. Nohara K, Yokoyama Y, Kano K. The important role of caspase-10 in sodium butyrate-induced apoptosis. *Kobe J Med Sci* 2007; 53(5): 265-73.
 17. Kawakami H, Huang S, Pal K, Dutta SK, Mukhopadhyay D, Sinicrope FA. Mutant BRAF Upregulates MCL-1 to confer apoptosis resistance that is reversed by MCL-1 antagonism and cobimetinib in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2016; 15(12): 3015-27.
 18. Yarmohamadi A, Asadi J, Gharaei R, Mirzadeh M, Khoshnazar A. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances radiosensitivity in breast cancer cell line. *Journal of Radiation and Cancer Research* 2018; 9: 86.
 19. Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk Res* 2002; 26(5): 495-502.
 20. Willimott S, Wagner SD. miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells. *J Biol Chem* 2012; 287(4): 2608-17.
 21. Lin T, Ren Q, Zuo W, Jia R, Xie L, Lin R, et al. Valproic acid exhibits anti-tumor activity selectively against EGFR/ErbB2/ErbB3-coexpressing pancreatic cancer via induction of ErbB family members-targeting microRNAs. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1): 150.
 22. Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol* 2018; 8(5).
 23. Young AI, Law AM, Castillo L, Chong S, Cullen HD, Koehler M, et al. MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib. *Breast Cancer Res* 2016; 18(1): 125.
 24. Gilardini Montani MS, Granato M, Santoni C, Del PP, Merendino N, D'Orazi G, et al. Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)* 2017; 40(2): 167-80.
 25. Cohen AL, Soldi R, Zhang H, Gustafson AM, Wilcox R, Welm BE, et al. A pharmacogenomic method for individualized prediction of drug sensitivity. *Mol Syst Biol* 2011; 7: 513.
 26. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 2011; 13(4): 215.

Expression of miR-125 and MCL-1 and BCL-2 Anti-apoptotic Genes under the Influence of Valproic Acid Treatment in Breast Cancer Cell Lines

Nastaran Injinari¹, Zeinab Amini-Farsani², Hossein Teimori³

Original Article

Abstract

Background: One of the causes of death through breast cancer is drug resistance and the anti-apoptotic activity of cancer cells. Epigenetic factors are involved in both of these processes. Micro RNAs (miRNAs) are epigenetic agents that accelerate the inappropriate expression of cancer. Valproic acid is a histone deacetylase inhibitor that has anticancer activity. The aim of this study was to evaluate the effect of valproic acid on miR-125b expression as one of the tumor suppressor miRNAs in breast cancer, and the expression of BCL-2 and MCL-1 anti-apoptotic genes as possible targets of miR-125b in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines.

Methods: In this experimental study, MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines were first cultured in optimal conditions. Cell viability was measured at different concentrations of valproic acid at 48 and 72 hours using MTT assay. The expression of miR-125b and BCL-2 and MCL-1 genes was analyzed using real-time polymerase chain reaction (PCR). The data were analyzed using one-way ANOVA test.

Findings: Valproic acid significantly decreased the viability of both cell lines in dose- and time-dependent manner. It also led to a significant increase in miR-125b in both cell lines ($P < 0.010$). In MCF-7 cells, this drug led to a significant decrease in BCL-2 and MCL-1 genes ($P < 0.001$). But the difference in these two genes in MDA-MB-231 treated cells was not significant compared to the control group ($P > 0.050$).

Conclusion: Valproic acid may be suggested as a profitable option in cancer research, through its involvement in epigenetic processes, and its influence on the expression of BCL-2 and MCL-1 genes.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer, miRNA, Valproic acid

Citation: Injinari N, Amini-Farsani Z, Teimori H. **Expression of miR-125 and MCL-1 and BCL-2 Anti-Apoptotic Genes under the Influence of Valproic Acid Treatment in Breast Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(542): 1061-7.

1- MSc Student, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2- PhD in Molecular Genetics, Young Researchers and Elites Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

3- Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding Author: Hossein Teimori, Email: hteimori@skums.ac.ir