

Apoptotic Effect of Specific siRNA against HMGA2 on PC3 Prostate Adenocarcinoma Cell Line

Khajouee Ravari Sh^{1,2}, Baradaran B^{3*}

1. Department of Genetic, East Azarbaijan Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2. Department of Genetic, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +984133371440 Fax: +984133371311 E-mail: Behzad_im@yahoo.com

Received: Dec 23, 2015

Accepted: Jun 2, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: Prostate cancer is one of the main reasons of death between men. Although there are many methods for treatment of this cancer but most of the patients still are died of the postoperative recurrence and metastasis of disease. Over expression of HMGA2 gene was observed in many human malignancies such as colorectal cancer, thyroid, pancreatic carcinoma and lung cancers. The aim of this study was to investigate the effect of HMGA2 specific small interfering RNAs (siRNAs) on viability and apoptosis in PC3 prostate adenocarcinoma cell line.

Methods: siRNA transfection was performed with liposome approach. The cytotoxic effects of siRNA were determined using MTT assay on the PC3 cells and apoptosis was quantified using TUNEL assay.

Results: Transfection with siRNA significantly suppressed the expression of HMGA2 gene in dose dependent manner after 48 hours resulting in spontaneous apoptosis. Moreover, siRNA transfection had effects on prostate cancer cells viability.

Conclusion: Our results suggest that the HMGA2 specific siRNA effectively decreases prostate cancer cells viability and induces apoptosis in this cell line. Therefore it can be considered as a potent adjuvant in prostate cancer therapy.

Keywords: HMGA2; siRNA; PC3; Apoptosis; Cytotoxic

اثر آپوتوتیک siRNA اختصاصی HMGA2 بر رده سلولی PC3 آدنوکارسینوم پروستات

شیمیا خواجویی راوری^{۱،۲}، بهزاد برادران^{۳*}

۱. گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران ۲. گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی،

تبریز، ایران ۳. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۷۱۴۴۰ فاکس: ۰۴۱۳۳۷۱۳۱۱ پست الکترونیک: behzad_im@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان، سرطان پروستات می باشد. روش های درمانی متفاوتی برای درمان سرطان پروستات وجود دارد؛ اما بسیاری از بیماران مبتلا به سرطان پروستات از عود بیماری پس از عمل و متاستاز رنج می برند. افزایش بیان HMGA2^۱، یک پروتئین انکوژن، در انواع مختلف تومورهای بدخیم از قبیل سرطان کولورکتال، تیروئید، پانکراس، ریه با پیشرفت تومور همراه است. هدف از این مطالعه بررسی اثر RNA کوچک مداخله گر (siRNA) اختصاصی HMGA2 بر روی تکثیر سلولی سرطان پروستات می باشد.

روش کار: ترانسفکشن siRNA با استفاده از رویکرد لیپوزومی انجام گرفت. در این مطالعه که به صورت بنیادی می باشد، برای بررسی زیست پذیری سلول ها پس از ترانسفکشن توسط siRNA، تست MTT انجام گرفت. بررسی میزان آپوپتوز توسط تست TUNEL تعیین گردید.

یافته ها: ترانسفکشن siRNA بیان ژن HMGA2 را به صورت وابسته به دوز بعد از ۴۸ ساعت به طور معناداری سرکوب کرد و منجر به القا آپوپتوز گردید. همچنین ترانسفکشن siRNA، زیست پذیری سلول ها را تحت تاثیر قرار داد. نتیجه گیری: نتایج ما نشان داد که تیمار سلول های PC3 با siRNA اختصاصی HMGA2 به صورت مؤثر باعث القا آپوپتوز در سلول های سرطان پروستات می شود. در نتیجه می تواند به عنوان ادجوانت بالقوه در درمان سرطان پروستات در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: siRNA، HMGA2، PC3، آپوپتوز، سایتوتوکسیک

پذیرش: ۹۵/۳/۱۳

دریافت: ۹۴/۱۰/۲

مقدمه

سرطان یک فرایند چندمرحله ای است که در اثر خروج سلول ها از مسیرهای تنظیمی، تکثیری و تمایزی رخ می دهد. غیر حساس شدن به سیگنال های مهارکننده رشد، پتانسیل نامحدود تکثیر، مقاومت در برابر سیگنال های آپوپتوزی و فرار از سیستم ایمنی از جمله شاخص هایی هستند که اجازه می دهند سلول های سرطانی بر هموستاز فیزیولوژیک غلبه کنند و منجر به ایجاد سرطان شوند [۱]. سرطان پروستات یکی از شایع ترین انواع سرطان در میان

مردان است و شیوع آن در بسیاری از کشورها در حال افزایش می باشد. غربالگری و درمان سرطان پروستات یکی از مسائل چالش برانگیز در درمان می باشد [۲]. این بیماری در درجه اول مردان مسن با میانگین سنی ۷۰ سال را تحت تأثیر قرار می دهد. بالاترین میزان شیوع سرطان پروستات در استرالیا و نیوزیلند، شمال و غرب اروپا، و شمال آمریکا و کمترین میزان شیوع در جنوب و شرق آسیا و شمال آفریقا می باشد [۳]. برخی از مطالعات نشان داده اند که سرطان پروستات در مقایسه با اروپا و آمریکا، در

ایران شایع نیست [۴]. همچنین نشان داده شده بروز سرطان پروستات در مهاجران ایرانی به کشورهای غربی افزایش پیدا کرده است [۵]. درمان موضعی سرطان پروستات شامل پروستاتکتومی، پرتودرمانی، گاهی اوقات همراه با درمان های هورمونی و درمان هدفمند می باشد [۶]. به طور کلی، بیماران مبتلا به سرطان پروستات با خطر متوسط و بالا دارای نرخ مرگ و میر زیادی حتی بعد از پروستاتکتومی، پرتودرمانی و همچنین هورمون درمانی می باشند [۷].

شناخت مکانیسم های دخیل در ایجاد سرطان برای پیشبرد روش های درمانی، جهت درمان سرطان بسیار مهم می باشد. القاء آپوتوز یکی از ویژگی های مهم عوامل ضد تومور سایتوتوکسیک می باشد. RNA مداخله گر تکنیکی است که در آن mRNA اختصاصی می تواند توسط RNA دو رشته ای مورد هدف قرار گیرد [۸، ۹]. RNA کوچک مداخله گر (siRNA) برای مطالعه عملکرد ژن و بهبود بیماری مورداستفاده قرار می گیرد [۱۰]. siRNA طی دو مرحله که شامل مراحل شروع و اثر می باشد، تولید می شود. در مرحله ی شروع، RNA بلند دو رشته ای (۵۰۰-۲۰۰ جفت باز) توسط Dicer به قطعاتی با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید شکسته می شود و siRNA تولید می شود. siRNA مولکول های اجرایی این فرایند هستند. منشا این RNA دو رشته ای می تواند از ژنوم ویروسی، DNA باکتریایی یا RNA های سنتز شده توسط داده های بیوانفورماتیک باشد [۱۱، ۱۲]. در مرحله اثر، siRNA داخل یک کمپلکس چند پروتئینی به نام RISC^۱ قرار می گیرد. سپس رشته آنتی سنس siRNA، این کمپلکس را به سمت mRNA هدف هدایت می کند. در نتیجه آنزیم آرگونات که عضوی از کمپلکس RISC است، سبب شکست در mRNA می شود. با تخریب mRNA بیان ژن هدف متوقف می شود که به عنوان خاموش

سازی ژن پس از رونویسی شناخته می شود [۱۱، ۱۲]. اثر siRNA در درمان سرطان، توسط کارایی بالا، سرکوب ژن در مراحل پیشرفته رشد، هزینه کم در مقایسه با ژن درمانی [۱۳]، مقایسه اختصاصیت بالا در برابر روش های دیگر درمان سرطان از قبیل جراحی و شیمی درمانی مشخص شده است [۱۴]. علیرغم مطالعه های آزمایشگاهی و حیوانی، در آزمایش های بالینی، این تکنیک در انسان به موانعی از جمله بازدهی و ویژگی انتقال به بیمار، پایداری داروهای بر پایه RNA، به حداقل رساندن پاسخ های ایمنی از سوی بیمار و مدت زمان طولانی مصرف دارو برخورد می کند. بنابراین ارتقای روش های طراحی داروهای بر پایه RNA و فن آوری های مربوط به انتقال آن ها برای بهینه سازی بازده و کاهش عوارض جانبی ضروری است [۱۵]. محصور کردن اسیدهای نوکلئیک در پوشش های ویژه مصنوعی یا اعمال تغییرات شیمیایی در ساختار الیگنوکلئوتیدها و یا اتصال آن ها به مولکول های حامل ویژه، می توانند راه حل های مناسبی برای حل این مسائل باشند. مهم ترین مزیت استفاده از حامل های مصنوعی برای داروهای بر پایه RNA، ایجاد ویژگی بافتی و اختصاصی در انتقال موضعی یا عمومی دارو می باشد که در نهایت به ممانعت از انتقال عمومی، غیر ویژه، تخریب و تجزیه آن حین انتقال منجر خواهد شد [۱۶]. بنابراین ارتقای روش های طراحی داروهای بر پایه RNA و فن آوری های مربوط به انتقال آنها برای بهینه سازی بازده و کاهش عوارض جانبی ضروری است [۱۷].

^۱ RNA-Induced Silencing Complex

روش کار

کشت سلول

رده سلولی PC3 مربوط به آدنوکارسینوم پروستات با منشأ انسانی، از انستیتو پاستور ایران به صورت ویال خریداری گردید. رده سلولی مربوطه در محیط کشت RPMI-1640^۱، FBS 10%^۲، L-۲mM-گلوتامین، پنی سیلین به میزان ۱۰۰ unit/ml در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار ۵٪ CO₂ کشت داده شد. به منظور تعیین اثر بهینه siRNA، دو متغیر زمان و دوز در این تحقیق توسط Real-Time PCR نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی، با غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومولار تیمار شدند و پس از ۲۴-۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های تیمار نشده به عنوان سلول‌های گروه کنترل استفاده شد. علاوه بر این، به منظور بالا بردن بهره‌وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایش‌ها به صورت تریپلیکیته انجام شد.

ترانسفکشن siRNA

قبل از ترانسفکشن با siRNA، سلول‌ها در محیط RPMI-1640 فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. ترانسفکشن siRNA (غلظت نهایی ۸۰-۴۰ پیکومولار) با استفاده از ترانسفکشن ریجنت^۳ نوع لیپیدی (لیپوفکتامین)، انجام شد. siRNA و ترانسفکشن ریجنت توسط ترانسفکشن مدیا^۴ رقیق و به مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول‌ها مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن، محیط فاقد آنتی‌بیوتیک چاهک‌ها را به آرامی خارج و در ابتدا ۸۰۰ میکرولیتر ترانسفکشن مدیا و سپس مخلوط محلول به چاهک‌ها اضافه شد. سپس پلیت کشت سلول به مدت ۶ ساعت در انکوباتور CO₂ دار ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از

اتمام مدت زمان ۶ ساعت، به چاهک‌ها یک میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 به همراه FBS اضافه شد. در نهایت بررسی اثر siRNA و سرکوب بیان ژن HMGA2 توسط quantitative real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اثر سایتوتوکسیک با روش MTT

تست MTT یکی از روش‌های رنگ‌سنجی متداول برای بررسی میزان سمیت مواد بر حیات سلول است. MTT نمک زرد رنگ تترازولیوم محلول در آب می‌باشد که توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده احیا شده و به نمک فورمازان غیر محلول در آب تبدیل می‌شود. برای انجام این تست ۱۰^۳×۱۵ سلول در هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه توزیع شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور CO₂ دار انکوبه گردید. بعد از اینکه سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند با استفاده از غلظت‌های مختلف ترانسفکشن ریجنت عمل ترانسفکشن صورت گرفت، بعد از گذشت ۴۸ ساعت، سلول‌ها با بافر فسفات شستشو داده شدند. پس از آن محلول MTT به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و پلیت به مدت زمان ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محلول رویی چاهک‌ها خارج گردید و ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO^۵ به هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. در نهایت توسط الیزا ریدر، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ nm اندازه‌گیری شد. همچنین سه چاهک به عنوان بلانک در نظر گرفته شد تا مقدار جذب اضافی محیط حذف شود.

تست تانل به منظور تأیید آپوپتوز

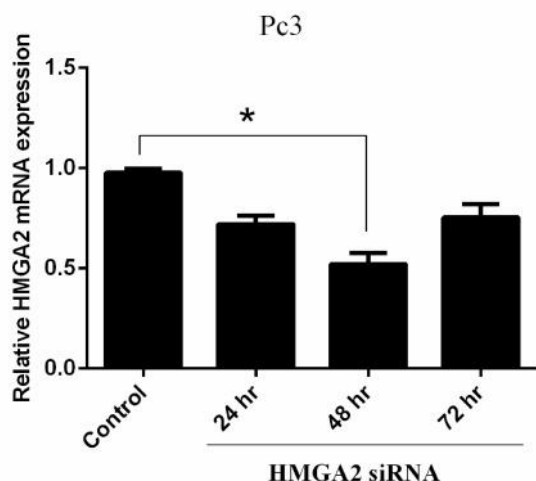
در این روش آنزیم ترمینال داکسی نوکلئوتید ترانسفراز باعث اتصال نوکلئوتیدهای متصل به فلوئورسین به انتهای آزاد DNA شکسته شده (مشخصه سلول‌های آپوپتوز شده می‌باشد) می‌گردد و آن را نشان‌دار می‌کند. در این تست ۱۰^۳×۱۵ سلول

^۵ Dimethyl Solfuxide^۱ RPMI-1640 Plus L-Glutamine Medium^۲ Fetal Bovin Serum^۳ siRNA Transfection Reagent^۴ siRNA Transfection Medium

یافته ها

سرکوب mRNA ژن HMGA2 توسط siRNA اختصاصی در سلول‌های سرطان پروستات در ابتدا، داده‌های کمی از هر نمونه در برابر β -actin نرمالیزه شد و بیان نسبی ژن مرتبط با نمونه کنترل متناظر (نمونه تیمار نشده)، که ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد توسط روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. نتایج نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، تیمار با siRNA اختصاصی سطح بیان mRNA ژن HMGA2 را کاهش می‌دهد (نمودار ۱ و ۲).

سطح بیان mRNA مربوط به β -actin (به عنوان کنترل داخلی برای qRT PCR) در تمام گروه‌ها مشابه بود. این اطلاعات نشان می‌دهد که مولکول siRNA اختصاصی HMGA2 می‌تواند به طور موثری باعث سرکوب بیان mRNA ژن HMGA2 در سرطان پروستات، بدون اثرات غیراختصاصی بر روی بیان mRNA مربوط به β -actin شود.



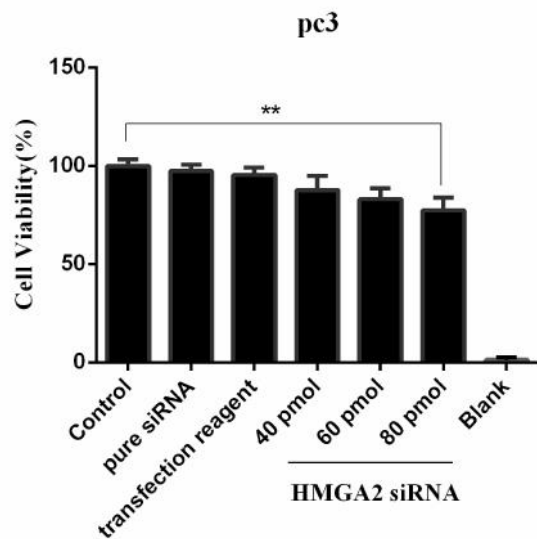
نمودار ۱. سرکوب ژن HMGA2 توسط siRNA در سلول‌های PC3
*سرکوب بیان ژن HMGA2 را نسبت به گروه کنترل با $p < 0.05$ نشان می‌دهد.

در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه پخش گردید و سلول‌ها تحت تیمار با siRNA اختصاصی HMGA2 قرار گرفتند. پس از گذشت مدت‌زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون، تست تانل با استفاده از کیت Roche Molecular Biochemicals انجام گرفت. در تست تانل، سلول‌ها توسط پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت یک ساعت در دمای اتاق فیکس شدند. بعد از شست‌وشو با بافر PBS^۱، سلول‌ها با محلول Blocking به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول Blocking خارج گردید و سلول‌ها توسط PBS شست‌وشو داده شدند. به منظور نفوذپذیری، سلول‌ها با محلول نفوذپذیری به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ انکوبه گردیدند. سلول‌ها دومرتبه توسط PBS شست‌وشو داده شدند و به هریک از چاهک‌ها ۵۰ میکرو لیتر TUNEL Reaction Mixture اضافه گردید و یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شد. پس از اتمام مدت‌زمان یک ساعت و سه مرتبه شست‌وشو با PBS، ۵۰ میکرو لیتر محلول Converter به چاهک‌ها اضافه گردید و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور و در تاریکی انکوبه گردید. پس از شست‌وشو با PBS، محلول DAB به سلول‌ها اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون صورت گرفت. در نهایت سلول‌ها از نظر میزان آپپتوز با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تحلیل آماری

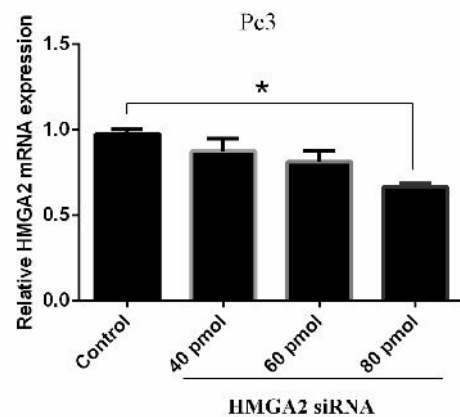
تست‌ها به صورت تریپلیکیت انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار توسط آمار توصیفی به دست آمد. آنالیز آماری One-way ANOVA توسط نرم‌افزار Graphpad Prism 6 انجام گردید و مقادیر $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

¹ Phosphate-Buffered Saline



نمودار ۳. اثر سایتوتوکسیک siRNA اختصاصی HMGA2 بر روی رده سلولی PC3. همینطور که در تصویر مشاهده می شود دوز ۸۰ پیکومولار siRNA بیشتر از سایر گروه ها باعث کاهش زیست پذیری سلول ها شده است.

** کاهش زیست پذیری سلول ها را نسبت به گروه کنترل با $p < 0.05$ نشان می دهد.



نمودار ۲. سرکوب ژن HMGA2 توسط siRNA در سلول های PC3

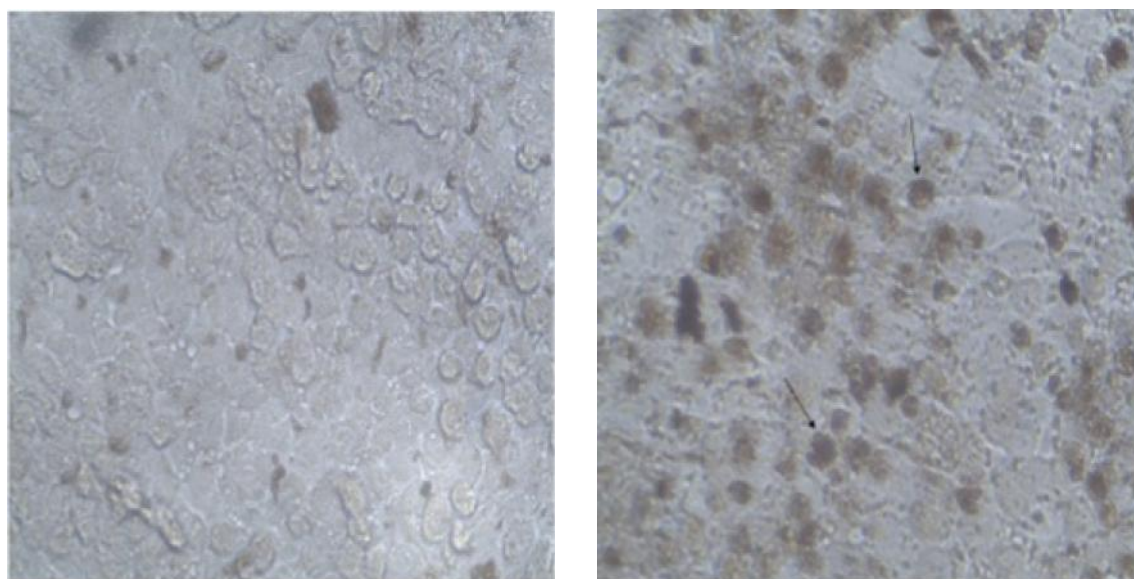
* سرکوب بیان ژن HMGA2 را نسبت به گروه کنترل با $p < 0.05$ نشان می دهد.

بررسی اثر سایتوتوکسیک siRNA اختصاصی HMGA2 با روش MTT

جهت بررسی و تعیین اثر سایتوتوکسیک وابسته به دوز siRNA اختصاصی HMGA2 در سلول های سرطان پروستات، تست MTT انجام گرفت. نتایج حاصل از تیمار سلول های PC3 در غلظت های ۶۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰ پیکومولار از siRNA اختصاصی HMGA2، ترانسفکشن ریجنت و siRNA خالص، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن در نمودار ۳ آورده شده است. همان طور که در نمودار نشان داده شده است، تیمار با siRNA اختصاصی HMGA2 سایتوتوکسیسیته را در روش وابسته به دوز القا می کند. نتایج تست MTT نشان می دهد که گروه تیمار شده با غلظت ۸۰ پیکومولار siRNA اختصاصی HMGA2، به طور قابل ملاحظه ای باعث کاهش قابلیت زیست پذیری سلول ها به میزان ۲۳٪ در مقایسه با گروه کنترل شد ($p = 0.003$) گروه تیمار شده با ترانسفکشن ریجنت در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری در قابلیت زیست پذیری سلول ها نشان نداد. علاوه بر این، گروه siRNA خالص کاهشی را در بقاء سلول در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد.

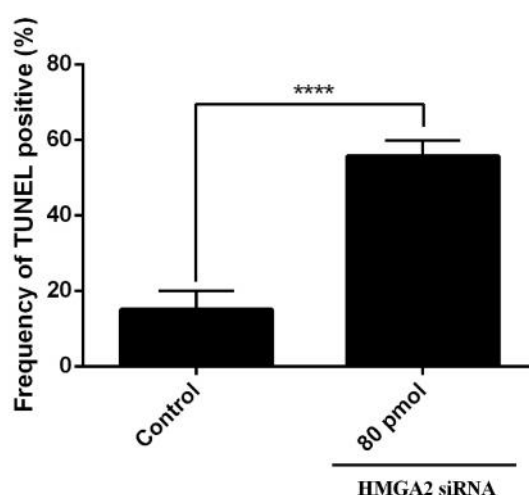
تعیین میزان آپوپتوز با تست TUNEL

همان طور که در شکل مشاهده می شود تیمار سلول ها با siRNA اختصاصی HMGA2، با افزایش آپوپتوز همراه بود. هنگامی که ترانسفکشن مولکول siRNA اختصاصی HMGA2 به سلول های PC3 انجام شد، تعداد سلول های زنده ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با دوز ۸۰ پیکومولار siRNA اختصاصی HMGA2 نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرد. پس از انجام تست تانل، هسته سلول های آپوپتوتیک به رنگ قهوه ای روشن تا تیره رؤیت شدند. نتایج در شکل نشان داده شده است.



A

B



C

شکل ۱. تست تانل برای تایید القاء آپپتوز: (A) کنترل منفی (سلول‌های PC3 بدون تیمار با siRNA اختصاصی HMGA2) (B) سلول‌های تیمار شده با دوز ۸۰ پیکومولار siRNA اختصاصی HMGA2. سلول‌هایی که با پیکان نشان داده شده‌اند سلول‌های آپپتوز شده هستند که هسته آن‌ها رنگ قهوه‌ای به خود گرفته است. (C) درصد سلول‌های آپپتوتیک شده (سلول‌های تانل مثبت).

بحث

درمان‌های رایج که معمولاً برای سرطان پروستات مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و درمان هدفمند می‌باشد [۶]. درمان مدرن به سمت درمان‌های اختصاصی‌تر حرکت کرده تا بتواند ویژگی‌های درمانی را افزایش و میزان عوارض جانبی را کاهش

دهد. از جمله درمان‌های مدرن می‌توان به روش ژن‌درمانی اشاره نمود. از جمله روش‌های ژن‌درمانی خاموش کردن ژن‌های مرتبط با سرطان می‌باشد که از مزایای این روش می‌توان به درجه بالایی از اختصاصی عمل کردن در خاموش سازی ژن [۱۳]، قدرت بالا و کارایی زیاد، قابلیت القا خاموشی در مراحل پیشرفته رشد، قابلیت انتقال خاموشی ژن

به نسل بعد و هزینه کم آن نسبت به دیگر روش‌های ژن درمانی اشاره نمود [۱۹، ۱۸]. ژن درمانی یکی از روش‌های جدید در مبارزه با بیماری‌های با منشأ ژنتیکی می‌باشد و امروزه در برخی از بیماری‌هایی که به دنبال اختلالات تک ژنی ایجاد می‌گردد جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. در بیشتر موارد برای افزایش حساسیت سلول‌های تومورال به روش‌های درمانی از این روش استفاده می‌گردد [۲۰، ۴]. RNA مداخله گر یا خاموش‌سازی ژن پس از رونویسی یک استراتژی قوی برای سرکوب ژن هدف می‌باشد که در آن RNA دو رشته‌ای (siRNA) به سلول‌ها وارد می‌شود و بیان ژن از طریق mRNA مربوطه سرکوب می‌شود. با توجه به مزایای RNA مداخله گر مانند اثربخشی، اختصاصیت و سمیت کم، این پدیده در مطالعات ژن درمانی به طور گسترده استفاده می‌شود [۲۱-۲۳]. آپتوز نقش اساسی را به عنوان مکانیسم حفاظتی در برابر سرطان با حذف سلول‌های آسیب‌دیده ژنتیکی و همچنین سلول‌هایی که به سمت بدخیمی پیشرفت کرده‌اند ایفا می‌کند [۲۴، ۱۴]. در نتیجه جهت بررسی القاء آپتوز مرگ سلولی القا شده توسط siRNA تست TUNEL انجام شد که مشابه آن در دیگر مطالعات بدخیمی‌های جامد مختلف [۲۵-۲۸] گزارش شده است که نقش بیولوژیکی مهم HMGA2 را در سرطان پروستات نشان می‌دهد. وانگ^۱ و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان تأثیرات انتخابی و ضد سرطانی باهدف قرار دادن ژن HMGA2 توسط siRNA انجام گرفت نشان داد که siRNA برای HMGA2 می‌تواند تکثیر سلول، تشکیل کلون، مهاجرت و آپتوز را در رده سلولی سرطان ریه تحت تأثیر قرار دهد و به این نتیجه رسیدند که هدف قرار دادن ژن HMGA2 به وسیله siRNA ها کاندید قوی برای ژن درمانی سرطان ریه است [۲۹]. ملک^۲ و همکاران در

مطالعه‌ای تحت عنوان ژن HMGA2 هدف امیدوارکننده برای خاموش کردن درمانی سرطان تخمدان انجام گرفت، نشان دادند که بیان HMGA2 در سرطان تخمدان افزایش پیدا می‌کند ولی در سطح سلول‌های طبیعی اپیتلیال تخمدان قابل تشخیص نیست و تأثیر خاموشی گذرا ژن HMGA2 با siRNA وابسته به توالی هدف و سطح اولیه بیان است. همچنین خاموشی دائمی HMGA2 با shRNA در رده‌های سلولی A27/80، OAW-42، OVCAR-3 مهار رشد و افزایش آپتوز را موجب شده بود [۲۶]. دی سلو^۳ و همکاران نشان دادند افزایش بیان HMGA2 منجر به تغییر فنوتیپ در سلول‌های نرمال ریه می‌شود، و سرکوب بیان HMGA2 همچنین تشکیل آن را در سلول‌های سرطانی ریه بلوکه می‌کند [۳۰]. ونکاستان^۴ و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان خاموش شدن ژن HMGA2 موجب القا عدم تنظیم مولکولی در سلول‌های رتینوبلاستومایی می‌شود نشان دادند که تنظیم کاهشی HMGA2 در رتینوبلاستوما به واسطه siRNA انجام گردید نشان دادند که با خاموشی ژن HMGA2 رشد سلول‌های رتینوبلاستوما سرکوب گردید [۳۱].

نتیجه‌گیری

درمجموع، در مطالعه حاضر مشخص گردید که HMGA2 نقش اساسی را در بقا سلول‌های PC3 ایفا می‌کند. سرکوب اختصاصی HMGA2 توسط siRNA به طور قابل توجهی آپتوز را در سلول‌های سرطان پروستات در شرایط آزمایشگاهی القا می‌کند. همچنین سرکوب بیان ژن HMGA2 موجب کاهش زیست پذیری سلول‌های سرطان پروستات می‌شود. مطالعه حاضر نشان داد که ژن HMGA2 می‌تواند به عنوان یک هدف مهم و بالقوه در ژن درمانی

³ Di Cello

⁴ Venkatesan

¹ WANG

² Malek

بیماران مبتلا به سرطان پروستات در نظر گرفته
اثرات سایتوتوکسیسیته که توسط داروهای
شیمی درمانی ایجاد می شود، را ندارد.

References

- 1-Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011 Mar; 144(5): 646-74.
- 2-Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *GLOBOCAN 2008*. *Int J Cancer*. 2010 Dec; 127(12): 2893-2917.
- 3-Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh J, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Feb; 49(6): 1374-1403.
- 4-Sadjadi A, Nooraie m, Ghorbani A, Alimohammadian M, Zahedi MJ, Darvish-Moghadam S, et al. The incidence of prostate cancer in Iran: results of a population-based cancer registry. *Arch Iran Med*. 2007 Dec; 10(4): 481-5.
- 5-Yavari P, Hislop TG, Bajdik C, Sadjadi A, Nouraei M, Babai M, et al. Comparison of cancer incidence in Iran and Iranian immigrants to British Columbia, Canada. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006 Jan; 7: 86-90.
- 6-Fu W, Madan E, Yee M, Zhang H. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2012 Apr; 1825(2):140-52.
- 7-White CW, Xie JH, Ventura S. Age-related changes in the innervation of the prostate gland: implications for prostate cancer initiation and progression. *Organogenesis*. 2013 Apr; 9(3): 206-15.
- 8-Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004 Nov; 432: 173-178.
- 9-Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T, et al. Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene therapy*. 2005 Feb; 12: 965-73.
- 10-Whelan J. First clinical data on RNAi. *Drug discovery today*. 2005 Aug; 10(15): 1014-5.
- 11-Pearson AS, Bouvet M, Evans DB, Roth JA. Gene therapy and pancreatic cancer. *Front Biosci*. 1998 Nov; 3: 230-237.
- 12-Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003 Mar; 22: 8581-9.
- 13-Fire AZ. Gene Silencing by Double-Stranded RNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie*. 2007 Aug; 46(37): 6966-84.
- 14-Mansoori B, Shotorbani SS, Baradaran B. RNA Interference and its Role in Cancer Therapy. *Adv Pharmbull*. 2014 Apr; 4(4): 313-21.
- 15-Samuel-Abraham S, Leonard JN. Staying on message: design principles for controlling nonspecific responses to siRNA. *FEBS*. 2010 Nov; 277(23): 4828-36.
- 16-Margus H, Padari K, Pooga M. Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. *Nature*. 2012 Nov; 20(3): 525-33.
- 17-Kiyoi H. Molecularly target therapy. *Nihon rinsho*. Europe PMC. 2012 Apr; 70: 211-16.
- 18-Rao DD, Wang Z, Senzer N, Nemunaitis J. RNA interference and personalized cancer therapy. *Discov Med*. 2013 Feb; 15: 101-10.
- 19-Burnett JC, Rossi JJ. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Cell*. 2012 Jan; 19(1): 60-71.
- 20-Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Pubmed*. 2006 Oct; 314(5796): 126-9.
- 21-Dev G. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Nature*. 2006 Jan; 13: 819-29.
- 22-Shan G. RNA interference as a gene knockdown technique. *Elsevier Ltd*. 2010 Aug; 42(8): 1243-51.

- 23-Yang M, Mattes J. Discovery, biology and therapeutic potential of RNA interference, microRNA and antagomirs. Elsevier Inc. 2008 Jan; 117(1): 94-104.
- 24-Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. SAGE Journal. 2007 Jun; 35(4): 495-51.
- 25-Meyer B, Loeschke S, Schultze A, Weigel T, Sandkamp M, Goldmann T, et al. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. Molecular carcinogenesis. 2007 Jul; 48(10): 2008-13.
- 26- Malek A, Bakhidze E, Noske A, Sers C, Aigner A, Schäfer R, et al. HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. Int. J Cancer. 2008 Jul; 123(2): 348-56.
- 27- Mahajan A, Liu Z, Gellert L, Zou X, Yang G, Lee P, et al. HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. Nature. 2010 Mar; 23(5): 673-81.
- 28-Fabjani G, Tong D, Wolf A, Roka S, Leodolter S, Hoecker P, et al. HMGA2 is associated with invasiveness but not a suitable marker for the detection of circulating tumor cells in breast cancer. Oncology reports. 2005 Sep; 14(3): 737-41.
- 29- Wang Q, Gong Y, Lü Y, Fei L, Liu H, Diao Y, et al. Selection and anti-cancer effects of siRNAs targeting HMGA2 gene. Pubmed. 2011 Mar; 46(12): 1444-50.
- 30- Di Cello F, Hillion J, Hristov A, Wood LJ, Mukherjee M, Schuldenfrei A, et al. HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. Mol Cancer Res. 2008 May; 6(5):743-50.
- 31- Venkatesan N, Krishnakumar S, Deepa PR, Deepa M, Khetan V, Reddy MA. Molecular deregulation induced by silencing of the high mobility group protein A2 gene in retinoblastoma cells. Molecular vision. 2012 Oct; 18: 2420-37.