

مهار تکثیر سلول‌های Calu-6 سرطان ریه با استفاده از shRNA ژن Cdc42

زهرا قمبری^۱، M.Sc، محمد نبیونی^{۱*}، Ph.D، هانیه جلالی^۲، Ph.D، لطیفه کریم زاده^۳، Ph.D Student

- ۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، تهران، ایران
- ۲- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران
- ۳- دانشجوی دکترا زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: devbiokharazmi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۶

چکیده

هدف: در پژوهش حاضر بیان ژن Cdc42 در سلول‌های Calu-6 مربوط به کارسینومای ریه با استفاده از سیستم مهارش shRNA کاهش یافته و اثرات این کاهش بر رشد و تکثیر سلولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: به منظور کاهش بیان ژن Cdc42 از مکانیسم مهارش shRNA استفاده شد. سیستم لنتی‌ویروسی برای رسانش shRNA اختصاصی ژن Cdc42 به سلول‌های Calu-6 انتخاب شد. لنتی‌ویروس‌های نوترکیب به کمک لیپوفکتامین و از طریق ترانسفکشن هم‌زمان سه پلاسمید pMD2G، psPAX2 و p-GFP-C-shLenti به درون سلول‌های 293T تولید شد. سلول‌های Calu-6 تحت تیمار با لنتی‌ویروس نوترکیب قرار گرفتند. صحت ترانسداکشن با میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ماندگاری زیستی سلول‌های Calu-6، با انجام سنجش MTT انجام شد.

نتایج: بررسی‌های میکروسکوپ فلورسنس در ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داد حدود ۸۰ درصد سلول‌های 293T ترانسفکت شدند.

نتایج میکروسکوپ فلورسنس پس از تیمار سلول‌های Calu-6 با ویروس نشان دهنده صحت ترانسداکشن این سلول‌ها است سنجش MTT نیز نشان داد که سرعت رشد سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی‌ویروس حاوی Cdc42-shRNA در مقایسه با سلول‌های کنترل، ۵۸ درصد و نسبت به سلول‌های کنترل منفی ۴۰ درصد کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: لنتی‌ویروس‌های نوترکیب، وکتورهای مناسبی جهت انتقال shRNA-Cdc42 به سلول‌های Calu-6 بوده و این انتقال منجر به کاهش تکثیر سلول‌های Calu-6 شد. کاهش میزان تکثیر سلول‌های سرطان ریه به واسطه سیستم مهارش لنتی‌ویروسی-shRNA یک اثر پایدار و طولانی مدت می‌باشد که می‌تواند در ژن‌درمانی این سرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: لنتی‌ویروس، سرطان ریه، ژن‌درمانی، shRNA، Cdc42

مقدمه

سرطان مجموعه‌ای از ۱۰۰ بیماری مختلف است که در طول زمان گسترش می‌یابد و زمانی ایجاد می‌شود که یک سلول، محدودیت‌های خود در تقسیم سلولی را از دست بدهد و شروع به تکثیر و رشد کنترل نشده کند. سرطان تقریباً می‌تواند در هر یک از بافت‌های بدن ایجاد شود که هر نوع از آن‌ها ویژگی‌های منحصر به فردی دارد. فرآیندهای اساسی که باعث ایجاد سرطان می‌شوند، در تمام انواع بیماری‌ها کاملاً مشابه هستند (۱ و ۲). سرطان ریه از سرطان‌های شایع در جهان می‌باشد که رتبه سوم شایع‌ترین سرطان در مردان و چهارمین آن در زنان را به خود اختصاص داده است (۳). سرطان ریه، اولین عامل منجر به مرگ در میان سرطان‌ها می‌باشد. در سال ۲۰۱۵، حدود ۱۵۸۰۴۰ نفر در اثر ابتلا به این سرطان جان خود را از دست دادند که حدود ۲۷ درصد مرگ ناشی از سرطان‌ها را در دنیا شامل می‌شود (۴). مجموع مرگ‌ومیر ناشی از سرطان ریه، به اندازه مجموع مرگ‌ومیر ناشی از سه سرطان پروستات، پستان و کولون است (۵). روش‌های درمانی سرطان ریه شامل جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است که به صورت مستقل و گاهی ترکیبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این حال، بسیاری از این گزینه‌های درمانی به مراحل اولیه تومور محدود می‌شوند و حتی گاهی پس از جراحی هنوز هم احتمال بازگشت تومور در این بیماران وجود دارد. بنابراین، امروزه استفاده از روش‌های درمانی جدیدتر که موثرتر و دارای اثرات جانبی کمتری هستند مورد توجه قرار گرفته است (۶).

یافته‌ها نشان می‌دهد که سرطان ریه می‌تواند در اثر تجمع تغییرات ژنتیکی در ژن‌های مهمی که محصول پروتئینی آن‌ها در کنترل حرکت سلولی، تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش دارد ایجاد گردد. شناسایی و مشخصه‌یابی این تغییرات ژنتیکی که منجر به پیشرفت و گسترش سرطان ریه می‌شود می‌تواند در تشخیص زود هنگام و پیشرفت درمان‌های هدفمند جدید کمک کند (۷).

ژن (Omim ID:) (Cdc42) Cell Division Cycle 42 (116952) عضوی از خانواده Rho GTPase ها و متعلق به سوپر خانواده Ras است. مطالعات نشان داده است که Cdc42 نقش مهمی را در تشکیل فیلوپودیا، حرکت سلول، حرکت جهت‌دار و رشد سلولی دارد (۸). تنظیم نامناسب ژن Cdc42 با بیماری‌های مختلف انسانی و/یا

ناهنجاری‌های تکوینی همراه است. به طوری که افزایش بیان آن در چندین سرطان مختلف از جمله سرطان بیضه، کولورکتال، سرطان پستان، کارسینومای سر و گردن، ملانوما (۱۲-۸) و سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک (Non small carcinoma lung cancer: NSCLC) دیده شده است (۱۰ و ۱۱). در اثر افزایش فعالیت ژن cdc42، تجزیه گیرنده فاکتور رشد اپی‌درمی (EGFR) که با واسطه c-Cbl صورت می‌گیرد مختل می‌شود که منجر به افزایش فعالیت EGFR و تحریک تجزیه پروتئوزومی p21CIP1 و در نهایت افزایش رشد و مهاجرت سلولی می‌گردد. این پیامدهای عملکردی ممکن است از طریق مسیرهای تنظیم PAK1، MLC، ERK1/2 و JNK انجام شود. علاوه بر این، مهار سیگنال‌های Cdc42 می‌تواند باعث مهار رشد سلولی و القا آپوپتوزیس از طریق مسیرهای سیگنالی PI(3)K- Akt و Erk و مهار کننده تومور p53 شود (۸).

ایده اولیه ژن‌درمانی بر پایه یک ژن یا محصول آن است که می‌تواند به صورت انتخابی و با حداقل سمیت به یک سلول/بافت خاص برسد. این محصول می‌تواند بیان یک ژن خاص را مهار کرده یا باعث بیان طبیعی ژن شود (۱۳). مکانیسم RNAi (RNA interference) یک فرآیند بیولوژیکی است که اجازه تجزیه کنترل شده mRNA (messenger RNA) های اختصاصی هدف را می‌دهد (۱۴). کشف‌های اخیر در مکانیسم RNAi و مسیرهای خاموش‌سازی ژن، انقلابی را در درک ما از مسیرهای تنظیمی ژن‌ها ایجاد کرده است. RNAi به عنوان یک ابزار تحقیقاتی برای کنترل بیان ژن‌های خاص در ارگانیسم‌های آزمایشگاهی مختلفی استفاده می‌شود و دارای پتانسیل درمانی برای کاهش بیان ژن‌های مورد نظر است (۱۵). این مکانیسم از سیستم‌های siRNA (Small interfering RNA یا shRNA) (short hairpin RNA) به‌عنوان یک ابزار رایج برای بررسی اثرات از دست دادن عملکرد ژن‌های مورد نظر در پستانداران، در کنار روش‌هایی همچون کشف داروهای درمانی استفاده می‌کند (۱۶).

مکانیسم RNAi از طریق سنتز شیمیایی siRNA و یا بر پایه shRNA عمل می‌کند. shRNA از طریق ویروس یا وکتورهای پلاسمیدی بیان می‌شود. دلیل استفاده از shRNA، اثر خاموش‌سازی پایدارتر در سلول‌ها است.

دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از دور ریختن محیط رویی با محلول ۱۰۰ میلی‌مولار کلسیم کلراید سرد انکوبه و مجدداً سانتریفیوژ گردید. مرحله انکوباسیون با کلسیم کلراید سرد و سانتریفیوژ مجدداً تکرار گردید و در نهایت باکتری‌های مستعد شده در محلول کلسیم کلراید سرد حاوی گلیسرول ذخیره شدند.

ترانسفورماسیون باکتری‌های مستعد شده با وکتورهای pMD2G و psPAX2، pGFP-C-shLenti برای تکثیر پلاسمیدهای مورد نظر، ابتدا باید این پلاسمیدها درون باکتری‌های مستعد وارد شوند. برای این منظور ترانسفورماسیون سوش DH5 α با روش شوک حرارتی انجام گردید. بدین صورت که پنج میکرولیتر از هر کدام از پلاسمیدها به صورت جداگانه به ۵۰ میکرولیتر از باکتری مستعد شده اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، به مدت ۴۵ ثانیه درون حمام آب ۴۲°C قرار گرفت و پس از ۲ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB Broth به آن اضافه شد و ۲ ساعت درون شیکر انکوباتور با دمای ۳۷°C و دور ۱۸۰ انکوبه گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده با پلاسمیدهای psPAX2 و pMD2G در محیط LB Agar حاوی آمپی‌سیلین و باکتری‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pGFP-C-shLenti در محیط LB-Agar حاوی کلرامفنیکل تکثیر یافتند.

استخراج پلاسمید: برای استخراج پلاسمیدها از کیت استخراج پلاسمید (Bio-Spin Mini-Prep Plasmid Extraction Kit) محصول شرکت Bioflux ژاپن استفاده شد و استخراج براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. برای بررسی کیفی صحت استخراج پلاسمید از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

کشت سلول: سلول‌های 293T (سلول‌های کلیه جنین) و Calu-6 (سلول‌های کارسینومای ریه) از انستیتو پاستور ایران خریداری گردید و در محیط کشت (RPMI 1640) (Roswell Park Memorial Institute medium) حاوی ده درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. به‌منظور تولید ویروس، سلول‌های 293T یک روز پیش از ترانسفکشن در پلیت ۶۰ سانتی‌متری کشت داده شدند.

shRNA مزیت‌های بیشتری نسبت به siRNA دارد چون نرخ تجزیه نسبتاً پایین‌تری دارد (۱۶). رسانش مؤثر و ایمن یک موضوع مهم در کاربردهای بالینی اسیدهای نوکلئیک به عنوان عوامل درمانی است (۱۳). وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی مختلفی برای رسانش ژن وجود دارد که هر کدام مزیت‌ها و معایب خاص خود را دارد. لنتی‌ویروس‌ها از رایج‌ترین سیستم‌های رسانش در ژن‌درمانی هستند و مزیت‌های زیادی نسبت به دیگر وکتورهای ویروسی دارند. مثلاً لنتی‌ویروس‌ها می‌توانند ژن‌های بزرگ با اندازه ۹-۸ کیلو باز را حمل کنند و سمیت کمی دارند (۱۶). وکتورهای لنتی‌ویروسی یک سیستم رسانشی کارآمد برای بیان پایدار و طولانی‌مدت shRNA در سلول‌های پستانداران است. وکتورهای لنتی‌ویروسی قادرند که shRNA‌ها را که می‌توانند برای کاهش بیان ژن اختصاصی مورد استفاده قرار گیرند وارد ژنوم سلول‌ها کنند. به این ترتیب shRNA به طور مداوم در سلول تولید می‌شود و با استفاده از سیستم میزبان، بیان ژن مورد نظر را کاهش می‌دهد (۱۷).

در پژوهش حاضر، ژن Cdc42 با استفاده از مکانیسم RNAi و با استفاده از shRNA اختصاصی ژن Cdc42 مورد هدف قرار گرفته و بیان آن در سلول‌های Calu-6 مرتبط با سرطان ریه توسط سیستم لنتی‌ویروسی کاهش یافت. با توجه به نقش ژن Cdc42 در تکثیر سلولی، اثر کاهش بیان این ژن بر میزان تکثیر سلول‌های سرطان ریه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری‌های مستعد: برای مستعد سازی باکتری E.Coli (Escherichia coli) سوش DH5 α ، از روش کلسیم کلراید و با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. بدین ترتیب که یک کلونی از کشت خطی باکتری DH5 α در پنج میلی‌لیتر محیط کشت Lysogeny LB (Broth) کشت شبانه داده شد. در روز دوم، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت LB broth با یک میلی‌لیتر کشت شبانه باکتری تلقیح شد و تا رسیدن به ۰/۳-۰/۴ OD₆₀₀=، در شیکر انکوباتور، با دور ۱۸۰ rpm و دمای ۳۷°C انکوبه گردید. سپس در دور ۳۸۰۰ g به مدت ۱۰

سپس این سلول‌ها در دمای 37°C به مدت ۴ ساعت با ۵۰ میکرولیتر محلول MTT انکوبه شدند. محیط رویی به‌آرامی کشیده شد و DMSO (Dimethyl sulfoxide) برای حل کردن محصول فورمازان به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه گردید. در نهایت جذب نوری هر نمونه در ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید و میزان تکثیر سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی‌ویروس‌های نوترکیب حاوی shRNA با سلول‌های کنترل (ترانسداکت شده فاقد Cdc42-shRNA) و کنترل منفی (ترانسداکت نشده) مقایسه شد.

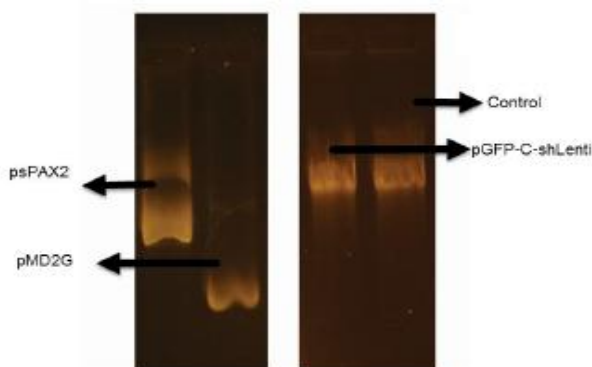
آنالیز آماری

سنجش MTT سه بار تکرار شد. معنی‌داری نتایج حاصل، با استفاده از نرم‌افزار InStat3 به دست آمد و نمودار با استفاده از نرم‌افزار مایکروسافت اکسل ۲۰۱۳ رسم شد.

نتایج

تکثیر و استخراج پلاسمید

برای بررسی کیفی و صحت استخراج پلاسمید از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. پنج میکرولیتر از پلاسمید با پنج میکرولیتر از رنگ لود کننده بر روی ژل، لود و دستگاه ران شد. باندهای مربوط به پلاسمیدهای psPAX2، pMD2G و pGFP-C-shLenti و کنترل در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: بررسی کیفی صحت استخراج چهار پلاسمید کنترل، pGFP-C-shLenti، psPAX2 و pMD2G با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز

تولید ویروس: برای تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب به عنوان حاملی برای رسانش ژن Cdc42، سلول‌های 293T، پس از رسیدن به تراکم ۹۰ درصد، هم‌زمان با سه وکتور لنتی‌ویروسی ترانسفکت شدند. بدین ترتیب که این سلول‌ها با ۱۰ میکروگرم پلاسمید pGFP-C-shLenti و پلاسمیدهای غشایی و بسته‌بندی psPAX2 و pMD2G با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ترانسفکت گردیدند. محیط کشت سلول‌های 293T، که حاوی ویروس‌های تولید شده است در مقاطع زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت جمع‌آوری شد. برای تولید لنتی‌ویروس کنترل (فاقد Cdc42-shRNA)، از پلاسمید فاقد توالی shRNA به همراه دو پلاسمید psPAX2 و pMD2G استفاده شد.

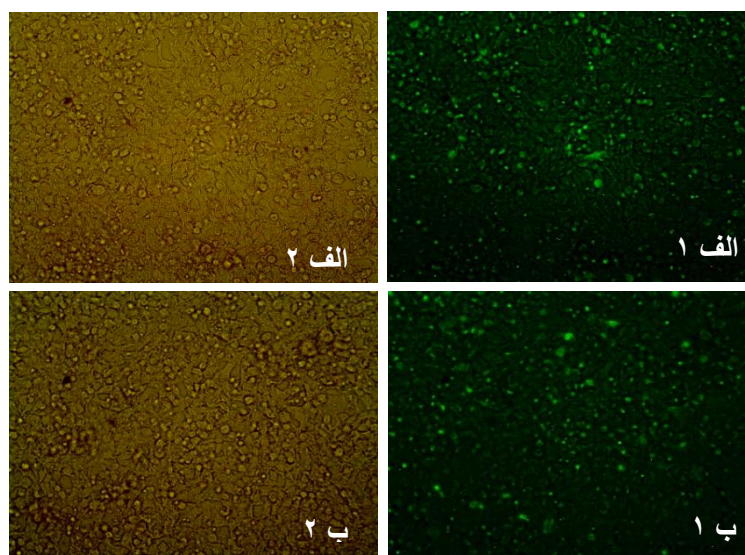
ترانسداکشن سلول‌های Calu-6. سلول‌های Calu-6 در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند و تحت تیمار رقت‌های مختلفی از لنتی‌ویروس‌های نوترکیب قرار گرفتند. برای افزایش بازده ترانسداکشن از پلی برن (Sigma Aldrich, UK) استفاده شد. دو روز پس از ترانسداکشن، سلول‌ها با آنتی‌بیوتیک پورومایسین تیمار شدند. تیمار آنتی‌بیوتیکی باعث کشته شدن سلول‌هایی شد که با ویروس آلوده نشده باشند و سلول‌های ترانسداکت شده به علت وجود ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک پورومایسین زنده ماندند. به این صورت، پس از دو روز تیمار آنتی‌بیوتیکی، همه سلول‌های آلوده نشده با ویروس از بین رفتند. به منظور بررسی کیفی ترانسداکشن از میکروسکوپ فلورسنس استفاده شد و بیان ژن گزارشگر GFP مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی تکثیر سلول‌ها با روش MTT به‌منظور بررسی اثر کاهش بیان ژن Cdc42 بر روند تکثیر و ماندگاری زیستی سلول‌های Calu-6، ماندگاری زیستی این سلول‌ها پس از ترانسداکشن، در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت، با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، تعداد ۲۰۰۰ سلول ترانسفکت شده و نیز نمونه‌های کنترل و کنترل منفی در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند.

ترانسفکشن سلول‌های 293T و تولید لنتی‌ویروس

نشان داد که حدود ۸۰ درصد از سلول‌های 293T آلوده به لنتی‌ویروس بوده و در حال تولید ذرات ویروسی بودند (شکل ۲).

۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن بیان ژن GFP در سلول‌های بسته‌بندی کننده 293T با میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده در زیر



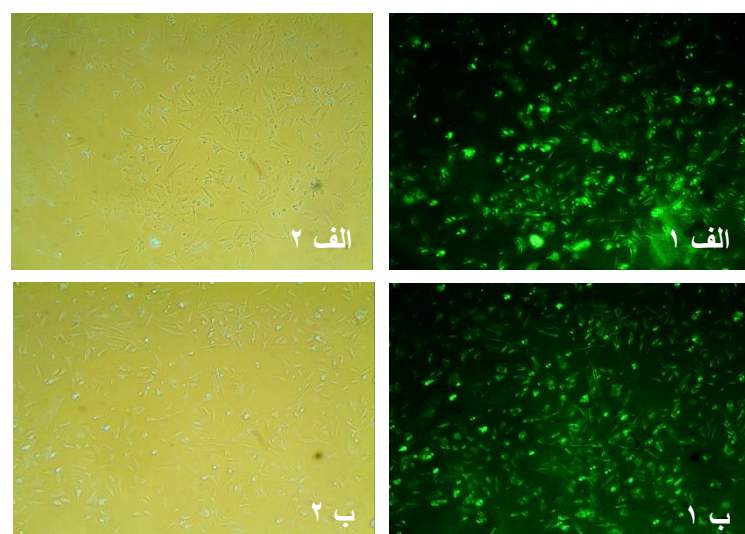
شکل ۲: الف ۱ و ۲) سلول‌های 293T ترانسفکت شده با پلاسمید کنترل فاقد Cdc42-shRNA. شکل ب ۱ و ۲) سلول‌های 293T ترانسفکت شده با پلاسمید GFP-C-shLenti.

میکروسکوپ و شمارش سلول‌های بیان کننده GFP

گرفت که نشان دهنده ترانسداکشن بخشی از سلول‌های Calu-6 توسط ذرات لنتی‌ویروسی حاوی GFP-shRNA-Cdc42 بود. تیمار آنتی‌بیوتیکی در طی دو روز منجر به حذف سلول‌های ترانسداکت نشده و بالا رفتن خلوص سلول‌های آلوده شد (شکل ۳).

ترانسداکشن سلول‌های Calu-6

سلول‌ها پس از کشت در پلیت، با MOI ۵۰ ترانسداکت شدند. یک روز پس از ترانسداکشن، جهت تأیید فرایند ترانسداکشن مشاهده در زیر میکروسکوپ فلورسوسورت

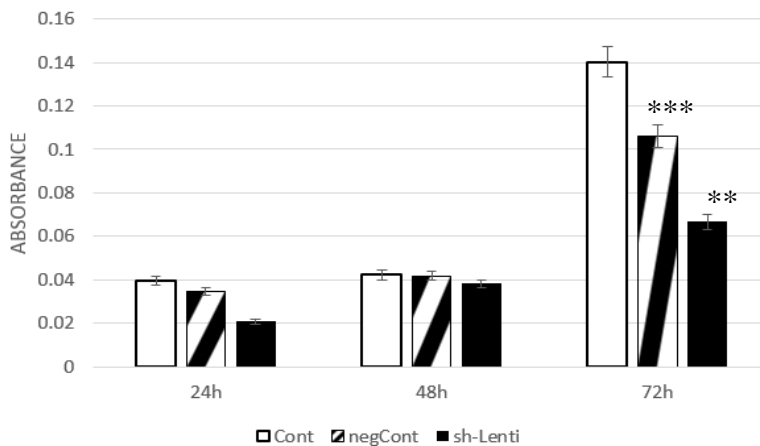


شکل ۳: الف ۱ و ۲) سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس کنترل فاقد Cdc42-shRNA. شکل ب ۱ و ۲) سلول‌های ترانسداکت

بررسی تکثیر سلول‌ها با MTT

نتایج حاصل از روش MTT نشان داد که نرخ سرعت رشد سلول‌های Calu-6، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت در سلول‌هایی که تحت آلودگی ویروسی قرار گرفته بودند نسبت به سلول‌های گروه کنترل و کنترل منفی تغییری نداشته است اما نرخ رشد این سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت

نسبت به سلول‌های کنترل منفی در سطح $p < 0.01$ و نسبت به سلول‌های کنترل در سطح $p < 0.001$ کاهش معنی‌داری یافت، به طوری که رشد سلول‌ها نسبت به سلول‌های کنترل ۵۸ درصد و نسبت به سلول‌های کنترل منفی ۴۰ درصد کاهش یافت (شکل ۴).



شکل ۴: نمودار بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها در طی ۷۲ ساعت. به منظور بررسی رشد و تکثیر سلول‌ها، سلول‌های ترانسداکت شده به همراه نمونه کنترل و کنترل منفی به تعداد ۲۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند. میزان رشد و تکثیر سلول‌ها روزانه و با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نمودار حاصل، میزان رشد سه گروه سلول ترانسداکت شده، کنترل منفی و کنترل را طی ۳ روز متوالی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان می‌دهد اگرچه سرعت رشد سلول‌ها در ۴۸ ساعت اول تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و کنترل منفی نشان نمی‌دهد اما سرعت رشد این سلول‌ها در ۷۲ ساعت پس از کشت، کاهش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های کنترل (با سه ستاره و $P < 0.001$) و کنترل منفی (با دو ستاره و $P < 0.01$) نشان می‌دهد.

بحث

Cdc42، یک عضو از خانواده Rho GTPase ها است که تنظیم نامناسب بیان آن می‌تواند عملکرد طبیعی سلول‌ها را تغییر داده و منجر به شروع مسیرهای سیگنالی مختلفی شود که در ارتباط با بیماری‌های مختلف از جمله سرطان می‌باشند (۱۸). بیان ژن Cdc42 در سرطان‌های مختلفی از جمله NSCLC افزایش می‌یابد و باعث پیشبرد فاز G1/S چرخه سلولی می‌شود (۱۹)؛ بنابراین به نظر می‌رسد می‌توان با کاهش بیان ژن Cdc42، پیشرفت تومور را کنترل کرد (۱۸).

Cdc42 را از طریق تغییرات پس از ترجمه و با افزودن گلوکز به یک ریشه سرین، مهار می‌کند و بدین ترتیب ارتباط cdc42 با غشاها مهار می‌شود و از انتقال سیگنال‌های پایین دست ممانعت به عمل می‌آید. سکرامین نیز برهمکنش Cdc42 با RhoGDI1 را پایدار کرده و باعث قفل شدن Cdc42 در حالت غیرفعال می‌شود. از سوی دیگر این دو مهار کننده عملکرد اختصاصی ندارند و علاوه بر Cdc42، Rho و Rac را نیز مهار می‌کنند. بنابراین، این مهار کننده‌ها دارای عملکرد اختصاصی نبوده و استفاده از آن‌ها در پژوهش‌های مربوط به Cdc42 در فرایندهای پیچیده سلولی محدود است (۲۰). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط Karin Zins و همکاران انجام شد از کوچک مولکول AZA197 برای مهار Cdc42 استفاده گردید. این پژوهش نشان داد که کوچک مولکول AZA197 می‌تواند با هدف قرار دادن انتخابی Cdc42، رشد، تهاجم و متاستاز را در سلول‌های SW620 و HT-

در سال‌های اخیر پژوهش‌های مختلفی در رابطه با کاهش بیان ژن Cdc42 در سلول‌های سرطانی با استفاده از مهارکننده‌ها صورت گرفته است. دو مهار کننده معمول برای Cdc42، شامل toxin B و Secramine است که هر دو محدودیت‌هایی در استفاده دارند. توکسین B،

افزایش بیان آن و در نتیجه توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 می‌شود. بررسی‌های بیشتر نشان داد که افزایش بیان این miRNA منجر به کاهش بیان Cdc42 می‌گردد؛ در واقع miR-29a نقش مهار کننده تومور را در سرطان پستان دارد و عملکرد خود را با توقف چرخه سلولی از طریق تنظیم منفی ژن Cdc42 اعمال می‌کند (۲۶). CHENG ZHAO و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که miR-195 به عنوان یک سرکوبگر تومور عمل می‌کند. افزایش بیان آن و در نتیجه کاهش بیان ژن Cdc42 که به عنوان هدف این miRNA است می‌تواند رشد سلول‌های سرطان مثانه را احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیر STAT3 مهار کند. از سوی دیگر، افزایش مقدار Cdc42 می‌تواند اثر مهاری ناشی از افزایش بیان miR-195 را بر رشد سلول‌های سرطان مثانه از بین ببرد (۲۷). Karen J. Humphreys و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که miR-18a می‌تواند Cdc42 را مهار کند و بدین‌صورت نقش یک سرکوب‌کننده تومور را در سرطان کولورکتال ایفا می‌کند (۲۸). Yuefeng Li و همکاران (۸) نشان دادند که MiR-330 می‌تواند با هدف قرار دادن Cdc42 در سلول‌های سرطان کولورکتال، رشد این سلول‌ها را تنظیم کند. Liu M و همکاران (۲۹) نشان دادند که miR-137 می‌تواند با هدف قرار دادن ژن Cdc42 هم در سطح پروتئین و هم در سطح mRNA، بیان آن را کاهش دهد که منجر به توقف چرخه سلولی در مرحله G1 و مهار رشد و تهاجم سلول‌های سرطانی کولورکتال می‌شود.

باید توجه داشت که یکی از معایب استفاده از miRNA جهت هدف قرار دادن ژن مورد نظر، اختصاصیت پایین آن در مقایسه با siRNA و shRNA است. زیرا miRNA عملکرد اختصاصی برای یک ژن خاص ندارد و گاهی می‌تواند حتی تا ۱۰۰ ژن را مورد هدف قرار دهد (۳۰). shRNA بر خلاف siRNA که درون سیتوپلاسم ایجاد می‌شود، در هسته سنتز شده و پس از پردازش و انتقال به سیتوپلاسم در کمپلکس RISC مشارکت می‌کند. میزان لود شدن siRNA در کمپلکس RISC، ۱۰ برابر کمتر از shRNA است و از سوی دیگر، shRNA بازده بالاتری در عملکرد خود نسبت به siRNA دارد (۲۳).

29 سرطان کلون مهار کند و آپوپتوزیس را از طریق کاهش بیان PAK1 و ERK افزایش دهد (۲۱). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۱ توسط QING-YONG CHEN و همکاران انجام شد از کورکومین به منظور مهار بیان ژن Cdc42 استفاده گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که کورکومین می‌تواند با کاهش بیان ژن Cdc42، رشد، تهاجم و متاستاز را در رده سلولی 801D سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک مهار کند (۲۲). مکانیسم RNAi فرآیندی طبیعی است که در آن بیان ژن هدف به طور انتخابی و با اختصاصیت بالا مهار می‌شود. عوامل اختصاصی هدف در مکانیسم RNAi این پتانسیل را دارند که به صورت اختصاصی، اهداف مولکولی کلیدی که به صورت غیرطبیعی افزایش بیان یافته یا به طور مداوم تولید می‌شود و برای بقا تومور ضروری هستند را به منظور شخصی‌سازی درمان سرطان مهار کند (۲۳). گرچه این مکانیسم با چالش‌هایی مواجه می‌باشد اما به نظر می‌رسد مؤثرترین روش در درمان بیماری‌ها است. عملکرد RNAi با واسطه مولکول‌های (micro RNA) siRNA، miRNA (Small interfering RNA) و shRNA انجام می‌شود. این مولکول‌ها پس از پردازش و ورود به سیتوپلاسم شروع به تجزیه mRNA از طریق ماشین درونی سلول می‌کنند (۲۴). اگرچه این مولکول‌ها عملکرد تقریباً مشابهی را از خود نشان می‌دهند اما تفاوت‌هایی با هم دارند (۲۳). مقاله‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Yongqiang Li و همکاران منتشر شد نشان داد که miR-29a در سرطان ریه سلول‌های غیرکوچک کاهش می‌یابد. این کاهش بیان در ارتباط با متاستاز سرطان ریه است. ترانسفکشن این miRNA به سلول‌ها و در نتیجه افزایش بیان آن، منجر به مهار رشد سلولی، مهاجرت و متاستاز در سلول‌های NSCLC می‌شود. از سوی دیگر، ژن Cdc42 به‌عنوان هدف اصلی miR-29a شناخته شده است و در واقع miR-29a عملکرد سرکوبگری توموری خود در سلول‌های NSCLC را به‌واسطه مهار بیان ژن Cdc42 انجام می‌دهد (۲۵). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۶ توسط Mingliang Zhang و همکاران منتشر شد نشان داد که مقدار miR-29a در سلول‌های MDA-MB-453 سرطان پستان کاهش می‌یابد. ترانسفکشن این miRNA در سلول، باعث

داده‌های حاصل نشان داد که اگرچه در روز اول و دوم، تغییر معنی‌داری در سرعت روند تکثیر سلول‌های تیمار شده با لنتی‌ویروس در مقایسه با نمونه‌های کنترل و کنترل منفی وجود ندارد اما روز سوم کاهش معنی‌داری در سرعت رشد این سلول‌ها مشاهده گردید. این امر نشان می‌دهد وکتورهای لنتی‌ویروسی به خوبی توانسته‌اند ژن مورد نظر را به سلول هدف منتقل کنند و گزینه مناسبی برای انتقال ژن مورد نظر به سلول‌های هدف است. از سوی دیگر، کاهش سرعت رشد سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی‌ویروس نو ترکیب نشان می‌دهد ژن Cdc42 می‌تواند به عنوان یک هدف مهم در روند درمان هدفمند سرطان ریه مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که ژن Cdc42 نقشی کلیدی در تکثیر سلول‌های Calu-6 کارسینومای ریه ایفا می‌کند. هدف قرار دادن این ژن با استفاده از shRNA اختصاصی ژن Cdc42 و نیز استفاده از وکتورهای لنتی‌ویروسی جهت انتقال shRNA-Cdc42 به سلول هدف نشان داد که وکتورهای لنتی‌ویروسی ابزار مناسبی جهت انتقال shRNA-Cdc42 به سلول‌های Calu-6 بوده و این انتقال منجر به کاهش تکثیر سلول‌های Calu-6 شده است. کاهش میزان تکثیر سلول‌های سرطان ریه به واسطه سیستم مهارتی لنتی‌ویروسی - shRNA یک اثر پایدار و طولانی مدت می‌باشد که می‌تواند در ژن درمانی این سرطان مورد توجه قرار گیرد.

منابع

1. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, & Aggarwal BB. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res.* 2008; 25(9): 2097-116.
2. Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer.* 1991; 64(4): 631-44.
3. Dellaire G, Berman N J and Arceci J R. Cancer Genomics: From Bench to Personalized Medicine. Academic Press. 2014; 194-211
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(1): 5-29.
5. Dela Cruz CS, Tanoue LT and Matthyay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and

اگرچه پژوهش‌های زیادی در رابطه با مکانیسم RNAi و مولکول‌های siRNA و shRNA در حال انجام است اما به نظر می‌رسد حداقل در رابطه با ژن Cdc42 در این حیطه پژوهش زیادی با استفاده از مهار کننده‌های shRNA انجام نشده است. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۱ توسط QING-YONG CHEN و همکاران انجام شد، shRNA اختصاصی ژن Cdc42 با استفاده از لیپوفکتامین به درون سلول‌های 801D سرطان ریه ترانسفکت گردید که منجر به کاهش بیان ژن Cdc42 شد. کاهش بیان این ژن منجر به کاهش قدرت تهاجمی و متاستاز این سلول‌ها گردید (۲۲).

در پژوهش حاضر، از مکانیسم RNAi و مولکول shRNA جهت کنترل بیان ژن Cdc42 در سلول‌های Calu-6 کارسینومای ریه استفاده گردید و اثر آن بر روند رشد و تکثیر سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به بیان پایدار shRNA و بازده عملکردی بیش‌تر این مولکول نسبت به siRNA، shRNA به‌عنوان ابزاری مناسب جهت تعدیل بیان ژن مورد نظر انتخاب گردید. انتقال shRNA به سلول، نیازمند استفاده از وکتورهای مناسب می‌باشد. وکتورهای مورد استفاده در ژن‌درمانی شامل وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی است. ویروس‌ها رایج‌ترین وکتورها در ژن‌درمانی است و حدود ۷۰ درصد آزمایش‌های بالینی ژن‌درمانی از وکتورهای ویروسی استفاده می‌کنند (۳۲). وکتورهای ویروسی دو مزیت عمده دارند، که یکی بازده بسیار بالا آن در مقایسه با وکتورهای غیر ویروسی و دیگری توانایی در بیان طولانی‌مدت RNAi درمانی رسانش شده است (۳۲). در این پژوهش، برخلاف پژوهش QING-YONG CHEN، shRNA با استفاده از وکتورهای لنتی‌ویروسی وارد سلول شد. این روش این مزیت را دارد که shRNA را وارد ژنوم سلول می‌کند. بدین ترتیب این ژن به عنوان بخشی از ژنوم، به صورت مداوم بیان می‌شود.

سلول‌های Calu-6 کارسینومای ریه که سلول هدف ما در این پژوهش است مورد تیمار با لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب تولید شده قرار گرفت. بازده ترانسداکشن با میکروسکوپ فلورسنس مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از اطمینان از آلودگی سلول‌های Calu-6 با لنتی‌ویروس‌های نو ترکیب، اثر کاهش بیان ژن Cdc42 بر روند رشد و تکثیر این سلول‌ها در سه روز متوالی با روش MTT ارزیابی شد.

- 605-44.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
 7. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, et al. Loss of RhoB Expression in Human Lung Cancer Progression. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(8): 2742-50.
 8. Li Y, Zhu X, Xu W, Wang D, Yan J. miR-330 Regulates the Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Targeting Cdc42. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 431(3): 560-5.
 9. Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K and et al. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases Is Associated with Progression in Testicular Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(14):4799-805.
 10. Arias-Romero LE, and Chernoff J. Targeting Cdc42 in Cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2013; (11): 1263-73.
 11. Gao L, Bai L and Nan Qz,. Activation of Rho GTPase Cdc42 Promotes Adhesion and Invasion in Colorectal Cancer Cells. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013; 19:201-7.
 12. Vega FM and Ridley AJ. Rho GTPases in Cancer Cell Biology. *FEBS Letters*. 2008; 582(14):2093-101.
 13. Du F .S., Wang Y., Zhang R., and Li Z. C. Intelligent nucleic acid delivery systems based on stimuli-responsive polymers. *Soft Matter*. 2010; 6(5): 835.
 14. Naughton BJ, Han DD and Gu HH,. Fluorescence-Based Evaluation of shRNA Efficacy. *Anal. Biochem*. 2011; 417(1): 162-4.
 15. Mello CC and Conte D Jr,. Revealing the World of RNA Interference. *Nature*. 2004; 431(7006): 338-42.
 16. Kanungo J. Puromycin-Resistant Lentiviral Control shRNA Vector, pLKO.1 Induces Unexpected Cellular Differentiation of P19 Embryonic Stem Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 486(2): 481-485.
 17. Song H and Yang PC. Construction of shRNA Lentiviral Vector. *N Am J Med Sci*. 2010; 2(12):598-601.
 18. Qadir MI, Parveen A, Ali M,. Cdc42: Role in Cancer Management. *Chem Biol Drug Des*. 2015; 86(4):432-9.
 19. Zhu X, Li Y, Shen H, Li H, et al. miR-137 Inhibits the Proliferation of Lung Cancer Cells by Targeting Cdc42 and Cdk6. *FEBS letters*. 2013; 587(1):73-81.
 20. Hong L, Kenney SR, Phillips GK, Simpson D, et al. Characterization of a Cdc42 Protein Inhibitor and Its Use as a Molecular Probe. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(12): 8531-43.
 21. Zins K, Gunawardhana S, Lucas T, Abraham D, et al. Targeting Cdc42 with the Small Molecule Drug AZA197 Suppresses Primary Colon Cancer Growth and Prolongs Survival in a Preclinical Mouse Xenograft Model by Downregulation of PAK1 Activity. *J. Transl. Med.* 2013; 11:295.
 22. Chen QY, Jiao DM, Yao QH, Yan J, et al. Expression Analysis of Cdc42 in Lung Cancer and Modulation of Its Expression by Curcumin in Lung Cancer Cell Lines. *Int. J. Oncol.* 2012; 40(5): 1561-8.
 23. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: Similarities and Differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61(9):746-59.
 24. Xin Y, Huang M, Guo WW, Huang Q, et al. Nano-Based Delivery of RNAi in Cancer Therapy. *Molecular cancer*. 2017; 16(1):134.
 25. Li Y, Wang Z, Li Y, Jing R. MicroRNA-29a Functions as a Potential Tumor Suppressor through Directly Targeting CDC42 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol. Lett.* 2017; 13(5): 3896-3904.
 26. Zhang M, Guo W, Qian J, Wang B. Negative Regulation of CDC42 Expression and Cell Cycle Progression by miR-29a in Breast Cancer. *Open medicine (Warsaw, Poland)*. 2016; 11(1):78-82.
 27. Zhao C, Qi L, Chen M, Liu L, et al. microRNA-195 Inhibits Cell Proliferation in Bladder Cancer via Inhibition of Cell Division Control Protein 42 Homolog/signal Transducer and Activator of Transcription-3 Signaling. *EXP THER MED*. 2015; 10(3):1103-1108.
 28. Humphreys KJ, McKinnon RA, Michael MZ,. miR-18a Inhibits CDC42 and Plays a Tumour Suppressor Role in Colorectal Cancer Cells. Ed. Junming Yue. *PLoS ONE*. 2014; 9(11): e112288.
 29. Liu M, Lang N, Qiu M, Xu F, et al. miR-137 Targets Cdc42 Expression, Induces Cell Cycle G1 Arrest and Inhibits Invasion in Colorectal Cancer Cells. *Int. J. Cancer*. 2011; 128(6):1269-79.
 30. Davidson BL and McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet*. 2011; 12: 329-340.
 31. Baum C, Schambach A, Bohne J, Galla M. Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther.* 2006; 13(6):1050-63
 32. Chen Y, Du D, Wu J, Chan CP, Tan Y, Kung HF, He ML. Inhibition of hepatitis B virus

replication by stably expressed shRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 311(2):398-404.

Inhibition of lung cancer Calu-6 cell line proliferation using *Cdc42* gene shRNA

Ghambari Z, M.Sc¹, Nabiuni M, Ph.D^{1*}, Jalali H, Ph.D², Karimzadeh L, Ph.D. Student³

1. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran.
3. Department of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: devbiokharazmi@gmail.com

Received: 10 Aug. 2017

Accepted: 25 Feb. 2018

Abstract

Aim: In current study, we aimed to reduce *Cdc42* gene expression in lung carcinoma related cells, Calu-6, and assayed its effect on cell proliferation.

Material and Methods: To reduce the expression of *Cdc42* gene shRNA system was used and lentiviral system was selected to deliver *Cdc42* specific shRNA to Calu-6 cells. Recombinant lentiviruses produced by co-transfection of pMD2G, psPAX2 and p-GFP-C-shLenti plasmids into 293T cells using lipofectamin. Efficiency of transfection and transduction assessed by florescent microscopy. Viability of cells treated by recombinant lentiviruses assessed by MTT assay.

Results: florescent microscopy showed 80% transfection of 293T cells and high rate of Calu-6 cells transduction. MTT assay results revealed that viability of transduced Calu-6 cells reached to %58 and %40 in compare to control and negative control cells, respectively.

Conclusion: recombinant lentiviruses properly transfer *Cdc42*-shRNA into Calu-6 cells, leading to reduction of cell proliferation. Silencing of *Cdc42* gene expression using lentiviruses is persist and long-term effect which can be under attention for gene therapy of lung cancer.

Keywords: Lentivirus, Lung Cancer, Gene therapy, shRNA, *Cdc42*