



Evaluation of siRNA Effects on Expression Levels of snail and miR143 in Metastatic Breast Cancer Cells

Sattarivand M^a, Mohammadzadeh R^{b*}

^a Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

^{b*} Department of Biology, Maragheh University, Maragheh, Iran

Original Article

Use your device to scan
and read the article online



Citation: Evaluation of siRNA Effects on Expression Levels of snail and miR143 in Metastatic Breast Cancer Cells. Journal of Cell and Tissue . 2022;13(2):151 -166.

<https://10.52547/JCT/13.2.151>

KEYWORDS

Snail1, siRNA, miR-143,
Breast cancer

ABSTRACT

Aim: In the past decades, many efforts have been made with the aim of searching for new tools to treat cancer. In this regard, the discovery, investigation and application of techniques related to small interfering RNAs (siRNA) has been one of the most significant advances in the field of cancer detection and treatment. Small interfering RNA, sometimes known as short interfering RNA or silencing RNA, is usually 21 bp long and interferes with the expression of specific genes with complementary nucleotide sequences and prevents translation by degrading mRNA after transcription. Many studies have shown that siRNAs affect the regulation of the expression of some genes that play a role in cancers. siRNAs are effective on Snail transcription factors, which play an important role in the invasion and metastasis of cancer cells, and miR-143, which plays an important role in the pathogenesis of cancers. miRNAs together with transcription factors can disrupt the biological pathways involved in carcinogenesis. However, the exact effect of siRNA on the expression of snail1 and miRNA-143 genes in breast cancer cells is not completely clear. Based on this, the present study investigated the effects of siRNA on snail1 and miRNA-143 on breast cancer cells. **Material and Methods** were purchased from Pasteur Institute of Iran. The cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FBS. Snail1 gene kit (Santacruz biotechnology, California, USA) was used to treat cancer cells with

* Corresponding author. Tel.: +98-41 -372707 ; Fax+98-41 -372707

E-mail address: Rmohammadzadeh82@gmail.com

DOI: <https://10.52547/JCT/151.166>

Received: January 20, 2022; Received in revised form: May 17, 2022; Accepted: May 30, 2022

Original Article

© Author



specific siRNA. The cells were divided into two groups: control (no treatment) and treated cells (transfected with siRNA). In order to determine the effective time, the cells were exposed to a dose of 60 picomoles of siRNA for 24, 48 and 72 hours. Beta actin gene was used as internal control gene. Morphology of MDA-MB-468 metastatic cells were examined using light microscopy before and after specific gene transfection. Cell proliferation was checked by trypan blue staining. Snail1 and miR-143 gene expression levels were evaluated by qRT-PCR. Data were analyzed using t-test. **Results:** In this study, in MDA-MB-468 breast cancer cells, the relative level of Snail1 gene expression was significantly decreased in the effective time of 48 hours and when exposed to the effective dose of 60 pmol ($P < 0.0001$). However, the knockdown of Snail1 gene by specific siRNA in MDA-MB-468 cancer cells when exposed to an effective dose of 60 pmol and an effective time of 48 hours caused an increase in the relative expression level of miR-143 gene compared to the control group ($P < 0.0001$). Also, the growth rate of MDA-MB-468 cancer cells decreased with Snail1 gene knockdown. **Conclusion:** The results of this research showed that the transfection of MDA-MB-468 breast cancer cells by specific siRNA can successfully reduce the expression level of Snail1 gene and miR-143 gene. Proliferation and invasion of breast cancer cells.



ارزیابی اثرات siRNA بر سطح بیان ژن Snail1 و miR143 در سلول‌های متاستاتیک سرطان سینه

معصومه ستاری وند^۱، رضا محمدزاده^{۲*}

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران Rmohammadzadeh82@gmail.com

واژگان کلیدی	چکیده
miR-143, siRNA, snail1 سرطان سینه	<p>هدف: در دهه‌های گذشته تلاش‌های زیادی با هدف جستجوی ابزارهای جدید جهت درمان سرطان صورت گرفته است. در این راستا، کشف، بررسی و کاربرد تکنیک‌های مرتبط با RNA های مداخله‌گر کوچک (siRNA) یکی از قابل توجه‌ترین پیشرفت‌مداخله RNA ها در زمینه شناسایی و درمان سرطان بوده است. خاموش کننده نیز شناخته می‌شود، معمولاً RNA مداخله‌گر کوتاه یا RNA گر کوچک که گاهی به‌عنوان پس از رونویسی، با بیان ژن‌های خاص با توالی‌های نوکلئوتیدی mRNA جفت باز طول دارد و با تجزیه ۲۱ ها بر تنظیم siRNA مکمل تداخل می‌کند و از ترجمه جلوگیری می‌کند. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که ها بر فاکتورهای رونویسی siRNA بیان برخی ژن‌ها که در سرطان‌ها نقش دارند تأثیرگذار می‌باشند که در پاتوژنز سرطان‌ها نقش مهمی دارند miR-143 که در تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی و Snail1 miRNA موثر هستند. همراه با عوامل رونویسی می‌توانند مسیرهای بیولوژیکی دخیل در سرطان‌زایی را مختل کنند. حال آنکه، اثر دقیق siRNA بر بیان ژن‌های snail1 و miRNA-143 در سلول‌های سرطانی سینه کاملاً روشن نیست. بر این اساس مطالعه حاضر به بررسی اثرات siRNA بر snail1 و miRNA-143 بر سلول‌های سرطان سینه پرداخته است.</p> <p>مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی سلول‌های سرطانی سینه رده 864-BM-ADM انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت 0461-IMPR حاوی 01% SBF کشت داده شدند. جهت تیمار سلول‌های سرطانی با ANRiS اختصاصی، کیت ژن Snail1 (ygonlhncetoib zurcatnaS)lilanS (ASU, ainrofilaC) مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها به دو گروه کنترل (عدم تیمار) و سلول‌های تیمار شده (ترانسفکت شده با ANRiS) تقسیم‌بندی شدند. به‌منظور مشخص کردن زمان موثر، سلول‌ها تحت تأثیر دوز ۰۶ پیکومول ANRiS به مدت ۴۲، ۸۴ و ۲۷ ساعت قرار گرفتند. پس از بررسی بیان ژن و به‌دست آمدن زمان موثر در ادامه به‌منظور به‌دست آوردن دوز موثر سلول‌ها با سه دوز ۰۴، ۰۶ و ۰۸ پیکومول تیمار شدند. از ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. مورفولوژی سلول‌های متاستاتیک ADM-864-BM با استفاده از میکروسکوپ نوری قبل و بعد از ترانسفکت ژن اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. تکثیر سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو بررسی شد. سطح بیان ژن Snail1 و 341-Rim توسط RCP-TRq ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی-تست تجزیه و تحلیل شدند.</p> <p>نتایج: در این مطالعه در سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-468 سطح نسبی بیان ژن Snail1 در زمان موثر ۴۸ ساعت و در مواجهه با دوز موثر ۶۰ پیکومول دچار کاهش معنی‌داری شد ($P < 0.0001$). اما ناک داون ژن Snail1 توسط siRNA اختصاصی در سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-468 در مواجهه با</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹	

دوز موثر ۶۰ پیکومول و زمان موثر ۴۸ ساعت سبب افزایش سطح بیان نسبی ژن miR-143 در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.0001$). همچنین میزان رشد سلول‌های سرطانی MDA-MB-468 با ناک داون ژن Snail1 کاهش پیدا کرد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که ترانسفکت سلول‌های سرطان سینه رده MDA-MB-468 توسط siRNA اختصاصی با اثرات کاهشی و افزایشی که بر سطح بیان ژن Snail1 و ژن miR-143 داشته است می‌تواند به‌طور موفقیت آمیزی سبب کاهش تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان سینه می‌شود.

۱- مقدمه

سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در میان زنان است که دارای نرخ مرگ و میر قابل توجهی می‌باشد (۱). این سرطان اساساً در اثر تاثیر متقابل وراثت و محیط ایجاد می‌شود و علائم ظاهری آن شامل برآمدگی و تغییر شکل در سرطان پستان است. این سرطان دارای قدرت متاستازی بالایی بوده و می‌تواند در صورت عدم تشخیص و درمان به‌موقع به بافت‌های دیگر بدن متاستاز یابد و عوارض جبران ناپذیری را برجای گذارد (۲-۵). بررسی سلولی و مولکولی اتیولوژی سرطان پستان نشانگر آن است که سرطان پستان با فعالیت RNA های مداخله‌گر کوچک (siRNA) در ارتباط می‌باشد. در واقع siRNA می‌تواند با تنظیم بیان ژن در اتیولوژی سرطان پستان موثر بوده و به‌عنوان ابزاری برای درمان سرطان‌ها به‌ویژه سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد (۶). siRNA قادر است بر فاکتورهای رونویسی از جمله فاکتور رونویسی Snail اثر گذارد. خانواده Snail از جمله فاکتورهای رونویسی وابسته به روی می‌باشند که دارای انواع متعددی از جمله Snail1، Snail2 و Snail3 می‌باشد که در تشکیل لایه مزودرم نقش موثری دارند و از این‌رو در شکل‌گیری ساختار غده پستان نیز تاثیرگذار می‌باشند. نقش Snail در متاستاز سلول‌های متاستاتیک سرطانی با اثر کاهشی آن بر کاده‌رین E که از مهم‌ترین عنصر اتصالات سلولی است، ثابت شده است (۷). از سوی دیگر امروزه مشخص شده است که انواع میکرو RNA ها (miRNA) نیز در تکوین سرطان‌ها به‌ویژه سرطان سینه نقش به‌سزایی دارند. از میان miRNA ها، miR-143 می‌تواند با هدف قرار دادن مستقیم چندین mRNA در پاتوژنز سرطان‌ها از جمله سرطان پستان نقش مهمی ایفا نماید (۸). همچنین مطالعات نشان داده اند که فاکتور رونویسی Snail قادر است بیان برخی ژن‌های miRNA را تنظیم کند. این نتایج اثبات می‌کنند که فاکتور رونویسی Snail در تهاجم و متاستاز بسیاری از تومورها به‌ویژه در سرطان‌های اپی‌تلیالی از جمله سرطان پستان نقش قابل توجهی دارد (۹،۱۰). در واقع miRNA ها همراه با عوامل رونویسی در سلول‌های یوکاریوتی بر بیان mRNA ها تاثیر گذاشته و مسیرهای بیولوژیکی دخیل در سرطان‌زایی را مختل می‌کنند (۱۱، ۱۲). برخی از مطالعات اخیر نشان داده‌اند که miRNA ها بیان تعداد زیادی از ژن‌هایی را که در پیشرفت سرطان نقش دارند تنظیم می‌نمایند (۱۳، ۱۴). تحقیقات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که Snail ها می‌توانند به‌طور قابل توجهی تعاملات mRNA/miRNA را در مراحل اولیه متاستاز تغییر و دهند و بر این اساس بر فرآیند متاستاز و مهارت بر بیان ژن تاثیر قابل توجهی داشته باشند (۱۷-۱۵). و بدین ترتیب به‌کارگیری از RNA های مختلف می‌تواند به‌عنوان یک ابزار درمانی جهت مهار متاستاز به‌ویژه در سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد (۱۸-۲۰). از طرفی نتایج پژوهش‌ها حاکی از آن است که ارتباط قابل توجهی بین siRNA و miRNA ها وجود دارد (۲۱). مطالعات اخیر نشانگر آنند که siRNA ها می‌توانند باعث افزایش بیان ژن miR-143 گردند و افزایش بیان miR-143 می‌تواند از رشد سلول‌های سرطانی به‌ویژه سلول‌های سرطانی پستان جلوگیری کند (۲۲).

با توجه به شیوع گسترده سرطان پستان در زنان و قابلیت متاستاز این سرطان به بافت‌های مختلف بدن که آن را به‌عنوان یکی از سرطان‌های خطرناک مطرح می‌نماید (۱) و نیز با توجه به عوارض گسترده بالینی و اقتصادی حاصل از ابتلا به سرطان پستان در بیماران (۲) و همچنین نظر به اینکه مطالعات قبلی در خصوص تداخلات میان siRNA ها و ژن‌های خانواده Snail و miR-143 به‌ویژه در سلول‌های سرطانی پستان بسیار محدود می‌باشد، بر این اساس پژوهش حاضر به بررسی ارزیابی اثرات siRNA بر سطح بیان ژن Snail و miR-143 در سلول‌های متاستاتیک سرطان پستان می‌پردازد و نتایج حاصل از این پژوهش در حوزه اتیولوژی و مبانی سلولی و مولکولی بوده و می‌تواند به‌عنوان مارکرهای تشخیصی در مدیریت پیشگیری و درمانی سرطان پستان کاربرد داشته باشد.

۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی رده سلولی سرطانی متاستاتیک سینه (MDA-MB-468) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در کلیه مراحل اصول اخلاق در پژوهش با توجه به استانداردهای جهانی رعایت شد.

کشت و شمارش سلول‌های سرطانی: جهت کشت سلول‌ها، از محیط کشت RPMI-1640+10% FBS استفاده شد. سلول‌های دفریز شده به فالكون حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط RPMI-1640 منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی ته فالكون به فلاسک ۲۵ میلی‌متر مربع حاوی ۷ تا ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل (RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS) منتقل شد و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن انتقال یافت. پس از کشت، شمارش سلولی با لام نئوبار انجام گرفت.

تیمار سلولی: در این تحقیق جهت تیمار سلول‌های سرطانی با siRNA اختصاصی، کیت ژن Snail (Santacruz biotechnology California, USA) مورد استفاده قرار گرفت. پس از دریافت کیت، محلول‌های موجود در ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. مطابق دستورالعمل کیت، از آب بدون RNase برای رقیق کردن استوک اصلی استفاده شد. سلول‌ها به دو گروه کنترل (عدم تیمار) و سلول‌های تیمار شده (ترانسفکت شده با siRNA) تقسیم‌بندی شدند. جهت تعیین زمان و دوز موثر siRNA، ابتدا سه پلیت ۶ خانه ای، یکی برای زمان ۲۴ ساعت دیگری برای تایم ۴۸ ساعت و سومی برای زمان ۷۲ ساعت انتخاب شد. در هر پلیت یک چاهک برای ژن snail و سه چاهک هم برای کنترل در نظر گرفته شد. دوز در نظر گرفته شده برای این مرحله دوز مشخص و ثابت ۶۰ میکروگرم بر میکرولیتر برای هر ول بود. از دوز متوسط (PM60) استفاده شد. برای این منظور سلول‌های کنترل و تیمار شده در ابتدا تحت تاثیر دوز ۶۰ siRNA در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ قرار گرفتند و بعد از بررسی بیان ژن، زمان موثر به‌دست آمد و در نهایت در زمان موثر سلول‌ها تحت تاثیر سه دوز ۰.۴، ۰.۶ و ۰.۸ را قرار گرفتند تا دوز موثر نیز به‌دست بیاید. جهت کنترل داخلی از ژن بتا اکتین استفاده شد. در زمان و دوز موثر به‌دست آمده، سلول‌های متاستاتیک MDA-MB-468 قبل و بعد از ترانسفکت ژن اختصاصی مورد نظر، از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی تغییرات مورفولوژی حاصل از تیمار در سلول‌های سرطانی پرداخته شد. برای سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها از رنگ آمیزی تریپان بلو و مشاهده با لام نئوبار استفاده شد.

استخراج RNA: سلول‌های MDA-MB-468 در ابتدا در فلاسک‌های کوچک کشت داده شدند. پس از رسیدن به فراوانی مورد نظر سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و بعد از شستشوی سلول‌ها، مایع رویی را خارج نموده و رسوب سلولی باز شد سپس با استفاده از لام نئوبار تعداد سلول‌ها شمارش شد.

از هر رده سلولی $10^5 \times 6$ سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای پخش شد.

سلولها در مرحله بعد توسط siRNA اختصاصی تیمار شدند. بعد از گذشت زمان انکوباسیون و دوبار شستشو با PBS، در نهایت توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۲۵ درصد Trypsin/EDTA از کف پلیت جدا شدند و به فالکون منتقل گشته پس از سانتریفیوژ دور ۱۳۰۰ rpm به رسوب RNX™ PLUS - مدت ۱۰ دقیقه، بعد از باز کردن رسوب سلولی، یک میلی لیتر سلولی اضافه شد و بعد از ورتکس کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه نموده و تیوب حاوی نمونه به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. سپس در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. فاز آبی به تیوپهای RNase free ۱/۵ میلی لیتری منتقل نموده و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام گرفت. بعد از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به رسوب یک میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه شد و در ۷۵۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ انجام شد. رسوب با ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گشته، سپس خالص و میزان RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد. فاز آبی به تیوپهای RNase free ۱/۵ میلی لیتری منتقل نموده و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوباسیون انجام گرفت. بعد از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به رسوب یک میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه شد و در ۷۵۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ انجام شد. رسوب با ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گشته، سپس خالص و میزان RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ تعیین شد.

استخراج میکروRNA و سنتز cDNA برای تهیه اولین رشته cDNA از روی RNA کل استخراج شده در مرحله قبل، از کیت با نام تجاری (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) محصول کمپانی Fermentase استفاده شد. این کیت بر اساس آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ویروس سرطان MoloneyMurine که دارای خاصیت RNase خفیفی می باشد تهیه شده است. با استفاده از این کیت می توان سنتز cDNA از روی الگوهای بزرگ حتی ۱۳ kb را نیز انجام داد. سنتز رشته cDNA به کمک پرایمرهگزامر انجام شد که به صورت غیر اختصاصی در نقاط مختلفی از رشته RNA اتصال می یابد و در نتیجه تمامی رشته های RNA (اعم از mRNA, tRNA و rRNA) به عنوان الگوی سنتز مورد استفاده قرار می گیرند. بدین منظور جهت سنتز cDNA ابتدا از محیط کشت سلولی Total RNA استخراج شد. برای این منظور از کیت miRCURY RNA Isolation kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) استفاده شد. مطابق دستورالعمل جهت کنترل کیفی و خلوص Total RNA استخراج شده از Unisp RNA استفاده شد. پس از استخراج Total RNA، سنتز cDNA انجام گرفت. بدین منظور از کیت (Thermofisher scientific & USA) cDNA synthesis kit استفاده شد. ابتدا Total RNA رقیق شده و سپس محلول های واکنش شامل بافر واکنش آنزیمی و آب بدون نوکلئاز به آن اضافه شده و ۶۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد و سپس سریعاً در ۴ درجه سانتیگراد خنک شد.

ارزیابی بیان ژنی: پس از سنتز cDNA بیان ژنی با استفاده از qRT-PCR ارزیابی شد. جهت انجام qRT-PCR از PCR panels مخصوص miRNA استفاده شده جهت کنترل داخلی و کالیبراتور داخل پلیت از Unisp6 RNA استفاده شد. برای انجام RT-PCR ابتدا PCR SYBER Green master mix را با آب بدون نوکلئاز ترکیب کرده و سپس cDNA را به آن اضافه شد. پرایمرهای طراحی شده برای miRNAs از نوع Stem loop می باشند. لازم به ذکر می باشد که تمام مواد در حین انجام کار و قبل آن باید روی یخ باشد. در مراحل عمل برای ارزیابی بیان نسبی هر ژن ابتدا مخلوطی از مواد مندرج در جدول ۱ تهیه و پس از توزیع ۱۹ میکرولیتر از مخلوط در لوله های مخصوص دستگاه، به هر کدام ۱ میکرولیتر از cDNA اضافه شد.

جدول ۱: مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR

اجزای واکنش	مقدار
Syber Green PCR Master Mix 2X	۱۰۰ μL
Forward Primer (5pmol/ 1μl)	۰.۳ μL
Reverse Primer (5pmol/ 1μl)	۰.۳ μL
cDNA(20ng)	۱ μL
DEPC Treated Water	۰.۴ μL

به عنوان بلانک تیوبی که حاوی تمام مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود مورد استفاده قرار گرفت و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC Water اضافه شد. همه مراحل بر روی یخ انجام شده و جهت جلوگیری از آلودگی در زیر هود لامینار انجام گرفت. سیکل‌های PCR برای تمام ژن‌ها بر اساس پروتکل جدول ۲ انجام شدند.

جدول ۱: پروتکل سیکل‌های به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR

Cycle	Cycle Point
Hold step	95 °C, 10 min
Cycling (45 repeats)	Step 1 at 95°C, hold 20 secs
	Step 2 at 59°C, hold 50 secs
	Step 3 at 72°C, hold 20 secs

پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار پرایمر تری (Primer3) طراحی شد و به صورت آنلاین در سایت NCBI تایید شد (جدول ۳).

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Gene	FW/RV	ترادف
Snail1	FW	5'-GGTTCTTCTGCGCTACTGCTG-3'
	RV	5'-GTCGTAGGGCTGCTGGAAGG-3'
β-actin	FW	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'
	RV	5'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'

در جدول فوق FW و RV به ترتیب بیانگر Forward و Reverse می‌باشند.

مقادیر و مواد مورد استفاده برای سنتز cDNA میکرو RNA در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴: مقادیر و مواد مورد استفاده برای سنتز cDNA میکرو RNA

مقدار	اجزای واکنش
۴۱ μ	5x Reaction buffer
۹۱ μ	Nuclease-free water
۱۱ μ	Enzyme mix
۲۱ μ	Synthetic RNA spike ins, optional replace with H2O if omitted
۴۱ μ	Template total RNA

جدول ۵ میزان مواد به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR میکرو RNA را نشان می‌دهد.

جدول ۵: مواد به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR میکرو RNA

مقدار	اجزای واکنش
۵۱ μ	PCR Master mix
۱۱ μ	PCR primer mix
۴۱ μ	Diluted cDNA template

جدول ۶ بیانگر پروتکل سیکل های به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR میکرو RNA است.

جدول ۶: پروتکل سیکل های به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR میکرو RNA

Cycle	Cycle Point
Hold step	95° C, 10 min 0 secs
Cycling (45 repeats)	95° C, hold 10 secs
ramp-rate	60° C, hold 60 secs 1.6 °C/s

جهت محاسبه بیان ژن از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

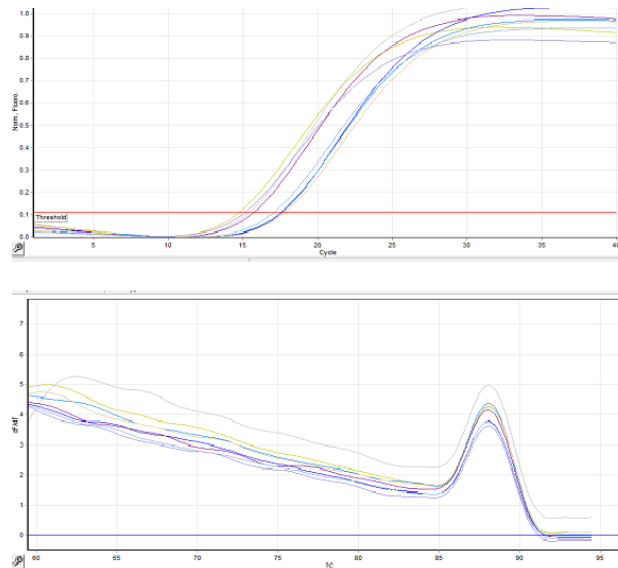
در پایان قبل از آنالیز داده ها، منحنی های ذوب به دست آمده از هر واکنش PCR جهت تایید صحت پیک مربوط به هر ژن مورد نظر و همچنین فقدان پرایمر دایمر بررسی شد. پرایمرهای طراحی شده برای miRNAs از نوع Stem loop بود. جهت محاسبه بیان ژنی از فرمول $\Delta\Delta\text{Ct}-2$ استفاده شد.

۳- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 6 صورت گرفت، شاخص های مرکزی شامل میانگین و انحراف معیار توسط آمار توصیفی به دست آمد. برای مقایسه گروه ها از آنالیز آماری t تست استفاده شد. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

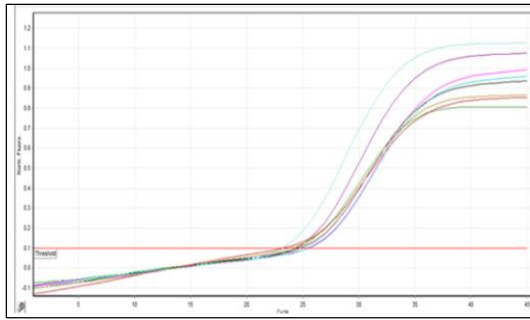
جهت تعیین زمان و دوز موثر منحنی آمپلی فیکاسیون و ذوب ژن بتا اکتین و ژن Snail1 به دست آمد (شکل ۱ و ۲).



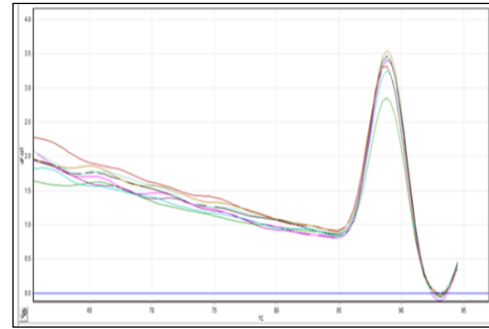
الف

ب

شکل ۱: منحنی آمپلی فیکاسیون و ذوب ژن بتا اکتین. الف) منحنی آمپلی فیکاسیون ژن بتا اکتین در سلول های تیمار شده و تیمار نشده با siRNA اختصاصی ژن Snail1 در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومول ب) منحنی ذوب ژن بتا اکتین در سلول های تیمار شده و تیمار نشده با siRNA اختصاصی ژن Snail1 در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومول در دستگاه Rotor-Gene 6000.



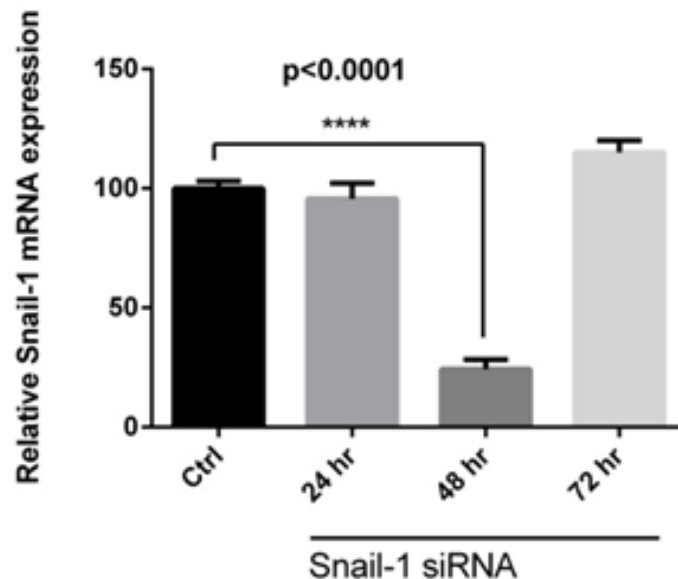
ب



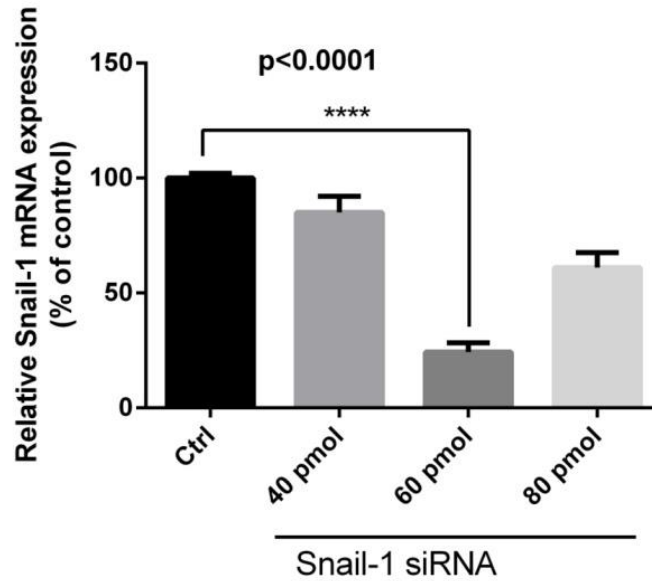
الف

شکل ۲: منحنی آمپلی فیکاسیون و ذوب ژن Snail1. الف) منحنی آمپلی فیکاسیون ژن Snail1 در سلولهای تیمار شده و تیمار نشده با siRNA اختصاصی ژن Snail1 در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومول (ب) منحنی ذوب ژن Snail1 در سلولهای تیمار شده و تیمار نشده با siRNA اختصاصی ژن Snail1 در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومول در دستگاه Rotor-Gene 6000

نتایج حاصل از بررسی siRNA اختصاصی بر بیان ژن Snail1 نشان داد که سطح نسبی بیان ژن Snail1 در سلولهای آدنوکارسینومای سینه در زمان موثر ۴۸ ساعت و دوز موثر با غلظت ۶۰ پیکومول دچار کاهش معنی‌داری شد ($p < 0.05$). درصد نسبی بیان ژن Snail1 در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۳، ۹۲ و ۳۱۱ درصد بود. همچنین درصد بیان نسبی ANRM در ژن Hians در غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومول به ترتیب ۵۸، ۴۲ و ۱۶ درصد بود. از سویی، سطح بیان ژن بتا اکتین جهت آنالیز کردن داده‌ها به کار برده شد (نمودار ۱ و ۲).

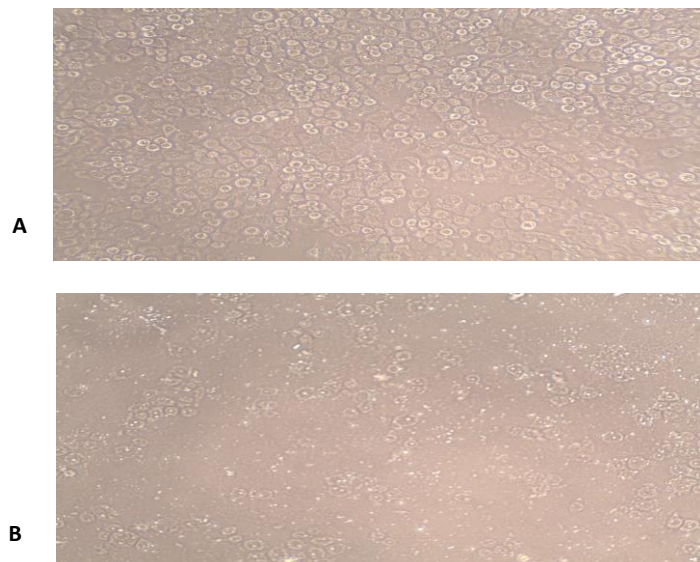


نمودار ۱: زمان موثر سرکوب ژن Snail1 توسط siRNA در رده سلولی MDA-MB-468. سلول‌ها با غلظت ۶۰ پیکومول از siRNA ترانسفکت شده و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، کل RNA سلول استخراج شده و سطح بیان نسبی mRNA در مقایسه با بتا اکتین ارزیابی شده است. داده‌ها به صورت $mean \pm SD$ نشان داده شده‌اند. $p < 0.0001$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.



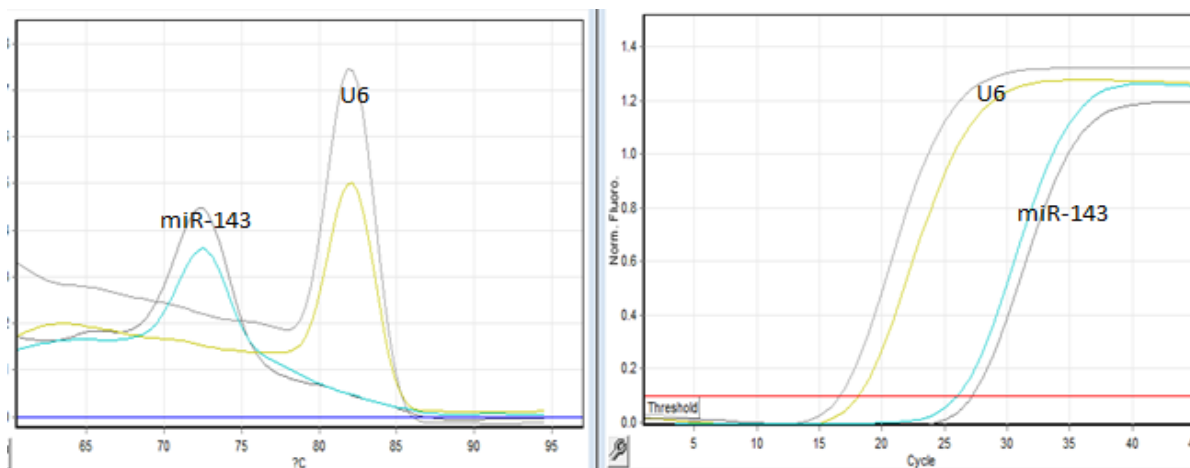
نمودار ۲: دوز موثر سرکوب ژن Snail1 توسط siRNA در رده سلولی MDA-MB-468. سلول‌ها با غلظت‌های ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پیکومول siRNA ترانسفکت شده و بعد از ۴۸ ساعت کل RNA سلول استخراج شده و سطح بیان نسبی mRNA در مقایسه با بتا اکتین (کنترل داخلی) با رزیابی شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده‌اند. $p < 0.0001$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی تاثیر siRNA اختصاصی ژن Snail1 بر مورفولوژی سلول‌های MDA-MB-468 نشان دادند که میزان رشد سلول‌های سرطانی با ناک داون ژن Snail1 کاهش پیدا می‌کند.

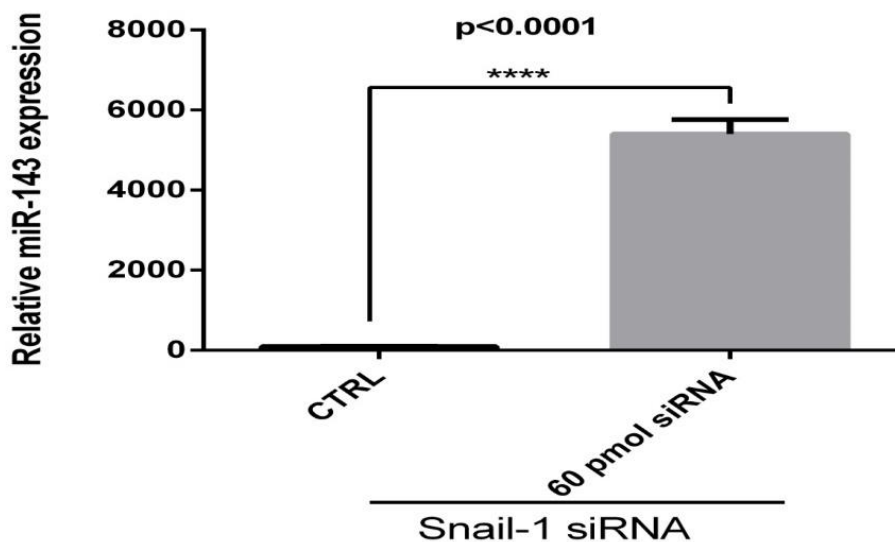


شکل ۳: تاثیر siRNA ژن Snail1 بر شکل ظاهری سلول‌ها در رده سلولی MDA-MB-468 سرطان سینه. A. تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار نشده با siRNA با عدسی ۴۰. B. تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با siRNA اختصاصی ژن snail1 با عدسی ۴۰.

نتایج حاصل از ارزیابی ناک داون ژن Snail1 توسط siRNA اختصاصی نشان دادند که ناک داون این ژن در سلولهای متاستاتیک سرطان سبب افزایش بیان نسبی miR-143 در دوز و زمان موثر در مقایسه با سلولهای تیمار نشده می شود (شکل ۴ و نمودار ۳).



شکل ۴: منحنی آمپلی فیکاسیون و ذوب miR-143 (الف) منحنی ذوب miR-143 در سلولهای تیمار شده و تیمار نشده با siRNA اختصاصی ژن snail1 (ب) منحنی آمپلی فیکاسیون miR-143 در سلولهای تریتم شده و تریتم نشده با siRNA اختصاصی ژن snail1 در دستگاه Rotor-Gene 6000.



نمودار ۳: تاثیر siRNA ژن Snail1 بر بیان miR-143 در سلولهای MDA-MB-468. سطح بیان نسبی miR-143 در سلولهای تیمار شده با غلظت ۶۰ پیکومول siRNA در مقایسه با سلولهای تیمار نشده مطرح شده و دادهها به صورت mean ± SD نشان داده شده اند. $p < 0.0001$ در مقایسه با کنترل می باشد. /۱۰۰۰

۵- بحث

نتایج این تحقیق نشان دادند که ژن snail در رده سلولی متاستاتیک سرطان سینه بیان می‌شود و در اثر ناک داون این ژن با siRNA اختصاصی، سطح بیان آن کاهش یافته و در مقابل سطح بیان miR-143 دچار افزایش می‌شود و بدین ترتیب این امر به‌طور موفقیت آمیزی سبب کاهش تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان سینه می‌شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که اثرات عملکرد میکروRNAها در درمان و کنترل سلول‌های سرطانی به‌ویژه سلول‌های سرطانی سینه اهمیت خاصی دارد.

در واقع سرطان پستان، دومین علت رایج مرگ ناشی از سرطان است و بر اساس آمارهای سازمان جهانی بهداشت از هر ۸ تا ۱۰ زن یک نفر دچار سرطان پستان می‌شوند و مارکرهای تشخیصی این سرطان می‌تواند سهم به‌سزایی در تشخیص و پیشگیری از آن ایفا نماید (۱-۴). همچنین عود موضعی و ویژگی متاستاتیک این سرطان از بارزترین ویژگی‌های آن می‌باشد که بر این اساس در مطالعه حاضر از رده سلولی متاستاتیک استفاده شده تا اثرات میکروRNA و ژن snail بر این ویژگی مورد بررسی قرار گیرد. در حقیقت روشن ساختن نقش مارکرهای اختصاصی سرطان سینه از موضوعات مهم برای تشخیص و پیشگیری و درمان سرطان سینه است و در همین راستا میکروRNAها به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های محافظت شده تنظیم کننده مرتبط با فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مطرح می‌باشند که نقش اساسی در تمایز، تکثیر و رگ‌زایی و نیز در فرآیند متابولیسم سرطان بازی می‌کند (۲۲-۲۴). بر همین مبنا در مطالعه حاضر miRNA-143 مورد تحقیق قرار گرفته است. تحقیقات نشان داده‌اند که siRNA اثرات مهمی بر فاکتور رونویسی دارد. در واقع و موافق با یافته‌های پژوهشی تحقیق حاضر، نتایج پژوهشی نشان داده‌اند که siRNA در رده سلولی سرطان سینه انسان (MDA-MB-231) و نیز سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa) به‌ترتیب از طریق سرکوب بیان mRNA PLK1 و HSF1 مانع از رشد سلول سرطانی می‌شود (۲۵). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که snail نقش اساسی در پیشرفت انواع سرطان‌ها از نظر ایجاد متاستازی، مهار آپوپتوزیس و چرخه سلولی در کارسینومای سینه (۲۶) و تخمدان (۲۷)، ملانوما (۲۸)، کارسینومای سنگفرشی دهان (۲۹) دارد. در بیشتر سرطان‌ها افزایش بیان snail همراه با کاهش بیان کادهرین E بوده (۳۰) و بنابراین snail به‌عنوان رده های سلولی معده، کبد، کولون، تخمدان و پستان موجب مهار کادهرین E و القای تهاجم در سلول می‌شود (۳۱-۳۳). نتایج یک تحقیق نشان می‌دهند که در سرطان پستان بیان زیاد snail موجب سرکوب بیان کلودین-۱ (Claudin-1) که یک پروتئین اینتگرال غشایی است، می‌شود و در نتیجه موجب پیشرفت تومور می‌شود (۳۴) و بالطبع کاهش بیان آن در پیش‌گیری از تکوین تومور نقش مهمی بازی می‌کند. مطالعه دیگری نشان داده که با ترانسفکت کردن سلول‌های سرطانی پستان با siRNA موجب سرکوب بیان ژن snail و توقف چرخه سلولی و مهار سرطان می‌شود (۱۷). در تحقیقی در خصوص بررسی مکانیسم اثر siRNA بر سلول‌های سرطانی، در آزمایشی چهار توالی اختصاصی STAT6 مخصوص siRNA در محیط *in vitro* و با استفاده از رده‌های سلولی ادنوکارسینومای کولون انسان و رده سلولی سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان دادند که خاموشی STAT6 توسط siRNA به‌طور قابل توجهی رویدادهای آپوپتوتیک را القا و تعداد سلول‌های سرطانی را در مدت زمان کوتاهی کاهش می‌دهد (۳۵). بنابراین هدف استفاده از siRNA در مطالعه حاضر مهار و خاموش کردن بیان ژن snail بوده است. از طرفی مطالعات مختلف در مورد میکروRNAها نشان داده‌اند که miR-143 از پیشرفت سرطان همانند سرطان معده و پروستات جلوگیری می‌کند و سطح بیان miR-143 در بسیاری از تومورها پایین می‌باشد بود که نشانگر نقش مهاری این میکروRNA در پیشرفت تومور است (۳۶-۳۸). همچنین یافته‌های پژوهشی نشان داده‌اند که miR-143 با تنظیم بالادست، بیان p-ERK5، ERK5 (extracellular signal-regulated kinase 5)، p-MAP3K7، MAP3K7 (mitogen-activated protein 3 kinase 7) و cyclin D1 و همچنین قابلیت زنده ماندن سلول را در سلول‌های MCF-7 کاهش می‌دهد در حالی که اثر miR-143 با تنظیم پایین دست سبب افزایش زنده ماندن سلول می‌شود. بدین ترتیب به‌نظر می‌آید که ERK5 و MAP3K7 ممکن است ژن‌های هدف miR-143 باشند (۳۹) Snail نقش کلیدی در تنظیم انتقال

اپی‌تلایال به مزانشیمی ایفا می‌کند، که مکانیسم اصلی مسئول پیشرفت و متاستاز تومورهای اپی‌تلایال است. با این وجود، فرآیندهای مختلفی را که مسئول رشد تومور هستند، مانند فعالیت سلول‌های بنیادی سرطانی، کنترل متابولیسم سلولی و تنظیم تمایز، تنظیم می‌کند. پروتئین‌ها و microRNA های مختلف ممکن است سطح SNAIL را تنظیم کنند و SNAIL ممکن است تنظیم کننده مهم بیان microRNA نیز باشد. تعامل بین SNAIL، microRNA ها، RNA های طولانی غیر کد کننده و RNA های حلقوی یک رویداد کلیدی در تنظیم رشد و متاستاز تومور است (۴۰). همچنین درباره مکانیسم اثر میکروRNAها، تحقیقات ثابت کرده‌اند که ترکیبات siRNA/miRNA با سایر عوامل ضد سرطان می‌توانند برای درمان مورد استفاده قرار گیرند (۱۴) درمان‌های ترکیبی متشکل از ANRIs دارای پتانسیل عظیمی در درمان سرطان هستند زیرا می‌توانند مجموعه خاصی از آنکوژن‌ها را دقیقاً خاموش کرده و مسیرهای متعدد بیماری مرتبط را هدف قرار می‌دهد (۴۲).

۶- نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که ترانسفکت سلول‌های سرطان سینه توسط siRNA اختصاصی با کاهش سطح نسبی بیان ژن snail1 و افزایش سطح نسبی بیان miR-143 می‌تواند به‌طور موفقیت آمیزی سبب کاهش تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان سینه شود و این امر می‌تواند در به‌کارگیری از روش‌های سلولی و مولکولی در درمان سرطان سینه نقش مهمی ایفا نماید.

۷- تشکر و قدردانی

این پژوهش با پشتیبانی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر انجام گرفته و بدین‌وسیله از زحمات این معاونت تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

۹- منابع

1. Malthaner RA, Wong RK, Rumble RB, Zuraw L, Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine*. 2004; 2(1):35.
2. Jin L, Han B, Siegel E, Cui Y, Giuliano A, Cui X. Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer Biol Ther*. 2018;19(10): 858-868.
3. Gray JM, Rasanayagam S, Engel C, Rizzo J. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ Health*. 2017;16(1): 94.
4. Antoniou A, Easton D. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*. 2006; 25(43): 5898-905.
5. Mustafa M, Nornazirah A, Salih F, Illzam E, Suleiman M, Sharifa A. Breast cancer: detection markers, prognosis, and prevention. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 2016; 15(08): 73-80
6. Yu R, Jih G, Iglesias N, Moazed D. Determinants of heterochromatic siRNA biogenesis and function. *Molecular cell*. 2014; 53(2): 262-76.
7. Thuault S, Tan E-J, Peinado H, Cano A, Heldin C-H, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(48): 33437-46.
8. Karimi L, Mansoori B, Mohammadi A, Aghapour M, Baradaran B. Function of microRNA-143 in different signal pathways in cancer: New insights into cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 91:121-31.
9. Musavi Shenaz SM, Mansoori B, Mohammadi A, Salehi S, Kaffash B, Talebi B, Babaloo Z, Shanebandi D, Baradaran B. SiRNA-mediated silencing of Snail-1 induces apoptosis and alters micro RNA expression in human urinary bladder cancer cell line. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2017; 45(5): 969-74.
10. Fu M, Blackshear PJ. RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on CCCH zinc finger proteins. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17(2): 130-143.
11. Lila E, Mullany, Jennifer S, Herrick, Roger K, Wolff, John R, Stevens, Wade Samowitz, Martha L. Slattery: Transcription factor microRNA associations and their impact on colorectal cancer survival. 2017; 56(11): 2512-2526.

12. Li F, Zhao H, Su M, Xie W, Fang Y, Du Y, Yu Z, Hou L, Tan W. HnRNP-F regulates EMT in bladder cancer by mediating the stabilization of Snail1 mRNA by binding to its 3' UTR. *EBioMedicine*. 2019; 45:208-219.
13. Huang S, Wu S, Ding J, Lin J, Wei L, Gu J, He X. MicroRNA-181a modulates gene expression of zinc finger family members by directly targeting their coding regions. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(20): 7211-8.
14. Huang M, Chen Y, Han D, Lei Z, Chu X. Role of the zinc finger and SCAN domain-containing transcription factors in cancer. *Am J Cancer Res*. 2019; 9(5): 816-836.
15. Przygodzka P, Papiewska-Pająk I, Bogusz-Koziarska H, Sochacka E, Boncela J, Kowalska MA. Regulation of miRNAs by Snail during epithelial-to-mesenchymal transition in HT29 colon cancer cells. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 1-1.
16. Barbu EA, Zhang J, Berenstein EH, Groves JR, Parks LM, Siraganian RP. The transcription factor Zeb2 regulates signaling in mast cells. *J Immunol*. 2012 15; 188(12): 6278-86.
17. Aletaha M, Mansoori B, Mohammadi A, Fazeli M, Baradaran B. The Effect of Snail1 Gene Silencing by siRNA in Metastatic Breast Cancer Cell Lines. *Iran J Public Health*. 2017; 46(5): 659-670.
18. Zhao W, Hou X, Vick OG, Dong Y. RNA delivery biomaterials for the treatment of genetic and rare diseases. *Biomaterials*. 2019; 217: 119291.
19. Mirna M, Paar V, Rezar R, Topf A, Eber M, Hoppe UC, Lichtenauer M, Jung C. MicroRNAs in Inflammatory Heart Diseases and Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction: A Potential Scope for the Future? *Cells*. 2019; 8(11): 1352.
20. Leng Q, Chen L, Lv Y. RNA-based scaffolds for bone regeneration: application and mechanisms of mRNA, miRNA and siRNA. *Theranostics*. 2020; 10(7): 3190-3205.
21. Zhou LL, Dong JL, Huang G, Sun ZL, Wu J. MicroRNA-143 inhibits cell growth by targeting ERK5 and MAP3K7 in breast cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2017 20; 50(8): e5891.
22. Ng EK, Li R, Shin VY, Siu JM, Ma ES, Kwong A. MicroRNA-143 is downregulated in breast cancer and regulates DNA methyltransferases 3A in breast cancer cells. *Tumor Biology*. 2014; 35(3): 2591-8.
23. Karami H, Baradaran B, Esfahani A, Sakhinia M, Sakhinia E. Therapeutic Effects of Myeloid Cell Leukemia-1 siRNA on Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2014; 4(3): 243-8.
24. Zaffaroni N, Daidone MG. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 002; 5(2): 65-72.
25. Hattori Y, Kikuchi T, Ozaki KI, Onishi H. Evaluation of in vitro and in vivo therapeutic antitumor efficacy of transduction of polo-like kinase 1 and heat shock transcription factor1small interfering RNA. *Exp Ther Med*. 2017; 14(5): 4300-4306.
26. Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells1. *Biochemical Journal*. 2006; 394(2): 449-57
27. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009; 119(6): 1420-8.
28. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999; 13(13): 1699-7-10.
29. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *nature*. 2001; 410(6824): 50-6.
30. Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, et al. A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Science signaling*. 2011; 4(191): ra60.
31. Liu J-P, Jessell TM. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development*. 1998; 125(24): 5055-67.
32. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 005; 132(14): 3151-61.
33. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*. 2004; 48(5-6): 365-75.
34. Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaró S. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochemical Journal*. 2006; 394(2): 449-57.

35. Salguero-Aranda C, Sancho-Mensat D, Canals-Lorente B, Sultan S, Reginald A, Chapman L. STAT6 knockdown using multiple siRNA sequences inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal and breast cancer cell lines. *PLoS One*. 2019; 14(5): e0207558.
36. Wu X-L, Cheng B, Li P-Y, Huang H-J, Zhao Q, Dan Z-L, et al. MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(43): 7758-65.
37. Wu D, Huang P, Wang L, Zhou Y, Pan H, Qu P. MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer. *Molecular medicine reports*. 2013; 8(2): 626-30.
38. Gregersen LH, Jacobsen A, Frankel LB, Wen J, Krogh A, Lund AH. MicroRNA-143 down-regulates Hexokinase 2 in colon cancer cells. *BMC cancer*. 2012; 12(1): 1-0.
39. Zhou LL, Dong JL, Huang G, Sun ZL, Wu J. MicroRNA-143 inhibits cell growth by targeting ERK5 and MAP3K7 in breast cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2017; 50(8): e5891.
40. Skrzypek K, Majka M. Interplay among SNAIL Transcription Factor, MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs in the Regulation of Tumor Growth and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(1): 209 PMID: 31947678; PMCID: PMC7017348.
41. Gandhi NS, Tekade RK, Chougule MB. Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: current progress and advances. *J Control Release*. 2014; 194: 238-56.
42. Wang Y, Xie Y, Kilchrist KV, Li J, Duvall CL, Oupický D. Endosomolytic and Tumor-Penetrating Mesoporous Silica Nanoparticles for siRNA/miRNA Combination Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020; 12(4): 4308-4322.