



Comparison of the Effects of Papaverine and Tamoxifen on the Expression of *CDK4*, *miR-146a*, and *miR-22* in DU145 Prostate Cancer Cell line

Momeni HR*, Etemadi T, Al Masoodi A, Azizi Z

- Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Momeni HR, Etemadi T, Al Masoodi A, Azizi Z. Comparison of the Effects of Papaverine and Tamoxifen on the Expression of *CDK4*, *miR-146a*, and *miR-22* in DU145 Prostate Cancer Cells line. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(2):161-173

<https://doi.org/10.66224/JCT.161>

KEYWORDS

CDK4 gene,
Papaverine,
Prostate cancer,
Tamoxifen.

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer is one of the most prevalent malignancies among men worldwide and represents a major cause of cancer-related morbidity and mortality. Despite advances in screening and therapeutic approaches, resistance to standard treatments, including androgen-deprivation therapy, remains a major clinical challenge in prostate cancer. As a result, identifying novel compounds that can suppress proliferation or modulate key molecular regulators of the cell cycle is of considerable interest. Papaverine is an isoquinoline alkaloid derived from the opium poppy, widely known for its long-standing clinical use as a smooth-muscle relaxant and vasodilator. In recent years, it has gained attention for its potential anticancer effects, including its influence on mitochondrial function, cellular energy metabolism, and the modulation of signaling pathways involved in cell cycle regulation. However, the specific effects of papaverine on prostate cancer cells have not yet been clearly elucidated. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator widely used in breast cancer therapy, has also demonstrated off-target antiproliferative effects in various tumor models.

Aims: The present study aimed to evaluate the effects of papaverine and tamoxifen on the viability and molecular regulatory profile of the DU145 prostate cancer cell line. Specifically, the study investigated the cytotoxic potential of these compounds at different concentrations and incubation times, and their ability to alter the expression of the *CDK4* gene, a key mediator of G1-to-S phase progression, along with two microRNAs, *miR-146a* and *miR-22*, known to influence cell cycle control and tumorigenic pathways. By integrating cellular and molecular findings, the study sought to clarify whether these compounds could serve as potential modulators of prostate cancer cell growth.

* Corresponding author. Tel: 08632627234

E-mail address: h-momeni@araku.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.66224/JCT.161>

Received: 16 May. 2026; Received in revised form: 9 Jun. 2026; Accepted: 23 Jun. 2026

Original Article

© Author



Materials and Methods: The DU145 human prostate cancer cell line was cultured under standard conditions and treated with different concentrations of papaverine and tamoxifen. Cell viability was assessed for 24, 48, and 72 hours using the MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Dose–response curves were generated to calculate IC50 values for each compound at the specified time points. To investigate molecular changes, total RNA was extracted from treated and control cells, and the expression levels of the *CDK4* gene, miR-146a, and miR-22 were quantified by Real-Time PCR with appropriate internal controls. Relative expression changes were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The data were analyzed using SPSS software. Results were presented as Mean $\pm$ SD, and a significance level of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Treatment of the DU145 prostate cancer cell line with various concentrations of papaverine and tamoxifen resulted in a significant reduction in cell viability in a concentration- and time-dependent manner, as measured by the MTT assay for 24, 48, and 72 hours. IC50 values were successfully determined for both compounds across the different time points.

Molecular analysis using Real-Time PCR showed that treatment with either papaverine or tamoxifen led to a marked downregulation of *CDK4* expression compared with untreated controls. In contrast, both compounds induced a significant up-regulation of miR-146a and miR-22 levels.

Discussion: The observed decrease in viability suggests that papaverine and tamoxifen exert notable antiproliferative effects on DU145 prostate cancer cells. The downregulation of the *CDK4* gene provides a mechanistic link to cell cycle arrest, as *CDK4* is a central regulator of G1-to-S phase progression. Such suppression is in line with reduced cellular proliferation and supports the therapeutic potential of these compounds.

The increased expression of miR-146a and miR-22 further highlights the involvement of tumor suppressive microRNAs in mediating these effects. Both miRNAs have been implicated in regulating pathways associated with proliferation, apoptosis, and oncogenic signaling. Their upregulation may contribute to the inhibition of cell growth through negative modulation of critical oncogenic targets.

These results align with prior evidence demonstrating tamoxifen’s antiproliferative effects, but also importantly emphasize that the molecular and cellular impacts of papaverine in prostate cancer remain poorly understood. The current findings provide initial insight into papaverine’s interaction with cell cycle regulatory genes and microRNAs, suggesting a potential role in prostate cancer growth inhibition. Considering the adverse effect profile associated with tamoxifen, papaverine may therefore represent a more favorable candidate for further investigation, particularly as a potential alternative with a potentially safer therapeutic window.

Conclusion: In conclusion, both papaverine and tamoxifen effectively reduced DU145 cell viability and modulated the expression of the *CDK4* gene, miR-146a, and miR-22, indicating their capability to interfere with cell cycle regulatory mechanisms. While their antiproliferative effects were broadly comparable, the established side effects of tamoxifen suggest limitations in its clinical applicability. Given that papaverine produced similar molecular outcomes without the same known adverse profile, it may be considered a potentially more suitable candidate for further preclinical evaluation in prostate cancer research.



مقایسه اثرات پاپاورین و تاموکسیفن بر بیان ژن *CDK4*، *miR-146a* و *miR-22* رده‌ی سلولی DU145 سرطان پروستات

حمیدرضا مومنی*، طاهره اعتمادی، ارکان المسعودی، زهرا عزیزی

- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
پاپاورین تاموکسیفن ژن <i>CDK4</i> سرطان پروستات	هدف: سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در مردان است و شناسایی ترکیباتی که قادر به مهار تکثیر سلولی و ایجاد تغییرات مولکولی مؤثر باشند، می‌تواند به توسعه راهبردهای درمانی جدید و بهبود مدیریت این بیماری کمک کند. در این مطالعه، اثر پاپاورین و تاموکسیفن بر میزان زنده‌مانی سلولی و بیان ژن‌ها و microRNAهای مرتبط با چرخه‌ی سلولی در رده‌ی سلولی DU145 سرطان پروستات مورد ارزیابی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: برای این منظور، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پاپاورین و تاموکسیفن تیمار و زنده‌مانی سلولی با سنجش MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. مقادیر IC50 تعیین و برای بررسی بیان ژن <i>CDK4</i> و <i>miR-146a</i> و <i>miR-22</i> از Real-Time PCR استفاده شد. نتایج: نتایج نشان داد که پاپاورین و تاموکسیفن به صورت وابسته به غلظت و زمان موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌های DU145 شدند. همچنین، کاهش معنی‌دار بیان ژن <i>CDK4</i> همراه با افزایش در سطح بیان <i>miR-146a</i> و <i>miR-22</i> مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده دخالت مسیرهای تنظیم‌کننده چرخه سلولی در اثرات مشاهده‌شده باشد. نتیجه‌گیری: این یافته‌ها حاکی از آن است که پاپاورین و تاموکسیفن ممکن است از طریق تنظیم بیان ژن‌ها و microRNAهای مرتبط با تکثیر سلولی، در مهار رشد سلول‌های سرطان پروستات نقش داشته باشند.

۱- مقدمه

سرطان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در جهان است. بر اساس آمار GLOBOCAN، تعداد مرگ‌های ناشی از سرطان از ۹/۶ میلیون مورد در سال ۲۰۱۸ به حدود ۱۰ میلیون مورد در سال ۲۰۲۰ رسیده است (۱). همزمان، شیوع جهانی سرطان نیز از ۱۸/۱ میلیون مورد جدید به ۱۹/۳ میلیون مورد افزایش یافته است، در حالی که نرخ مرگ‌ومیر در مردان حدود ۴۳٪ بالاتر از زنان گزارش شده است (۱،۲). در میان انواع سرطان‌ها در مردان، سرطان پروستات شایع‌ترین نوع و دومین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان محسوب می‌شود. در سال ۲۰۲۰، حدود ۱/۴۱ میلیون مورد جدید سرطان پروستات تشخیص داده شد که منجر به بیش از ۳۷۵۰۰۰ مرگ گردید (۱). شروع و پیشرفت سرطان پروستات نتیجه تعامل پیچیده عوامل ژنتیکی، هورمونی و محیطی است (۳). اگرچه در مراحل اولیه قابل درمان است، اما در مراحل پیشرفته و متاستاتیک اغلب درمان‌ناپذیر بوده و میانگین بقای بیماران در نوع مقاوم و متاستاتیک حدود ۳ تا ۷ سال گزارش شده است (۴،۵). از روش‌های رایج درمان سرطان پروستات، شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی است. با این حال، بروز مقاومت دارویی و

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۸۶۳۲۶۲۷۲۳۴

آدرس پست الکترونیک: h-momeni@araku.ac.ir

عوارض جانبی شدید، اثربخشی این درمان‌ها را محدود کرده است (۶). تاموکسیفن (Tamoxifen)، به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده استروژنی، هرچند داروی خط اول درمان سرطان پروستات نیست، اما مطالعات آزمایشگاهی متعدد اثرات ضدتکثیری، القای آپوپتوزیس و مهار مهاجرت آن را در رده‌های سلولی سرطان پروستات نشان داده‌اند؛ بنابراین، استفاده از آن به‌عنوان داروی مرجع در مطالعات قابل توجیه است (۷،۸). با این‌وجود، عوارض جانبی، مقاومت سلولی و اثرات غیراختصاصی تاموکسیفن، پژوهشگران را به‌سمت شناسایی ترکیبات طبیعی با سمیت کم‌تر و پتانسیل درمانی بالاتر سوق داده است (۹). بیش از ۶۰ درصد داروهای ضدسرطان موجود منشأ طبیعی دارند و گیاهان یکی از مهم‌ترین منابع این ترکیبات هستند. یکی از گیاهان دارویی مورد توجه در سال‌های اخیر، *Papaver somniferum L* (خشخاش) است. عصاره این گیاه حاوی آلکالوئیدهای متنوعی از جمله پاپاورین (Papaverine) است که مطالعات متعدد اثرات ضدسرطانی آن را در رده‌های سلولی مختلف از جمله سرطان پروستات (PC-3 و LNCaP) تأیید کرده‌اند (۱۰،۱۱). عصاره *Papaver somniferum* ترکیبات آن رشد سلول‌های سرطانی را از طریق القای آپوپتوزیس، توقف چرخه سلولی و تعدیل مسیرهای سیگنالینگ مانند NF- κ B/PI3K/AKT مهار می‌کند و در سلول‌های طبیعی سمیت بسیار پایینی دارند. علاوه بر این، گزارش‌هایی از فعالیت ضدسرطانی عصاره کامل *Papaver somniferum* در رده‌های سلولی سرطانی مختلف وجود دارد که آن را به گزینه‌ای امیدبخش با سمیت انتخابی تبدیل نموده است (۱۱).

ژن‌های خانواده Cyclin-dependent kinase (*CDK*)، به‌ویژه *CDK4*، در تنظیم چرخه سلولی و پیشرفت فاز G1 نقش محوری دارند (۱۲). در سرطان پروستات، افزایش بیان *CDK4* با مقاومت به درمان و پیش‌آگهی ضعیف همراه است. مهار *CDK4* می‌تواند توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس/اتوفاژی را تسهیل کند (۱۳). *CDK*‌های چرخه‌ی سلولی (1, 2, 4, 6) با کنترل نقاط بازرسی سلولی باعث پیشرفت از یک فاز به فاز دیگر می‌شوند. افزایش فعالیت آن‌ها در بسیاری از سرطان‌ها موجب تکثیر بی‌رویه‌ی سلول‌ها می‌گردد. *CDK* به‌عنوان کلیدهای اصلی تکثیر سلولی، نقش محوری در سرطان‌زایی دارند و به همین دلیل یکی از جذاب‌ترین و فعال‌ترین اهداف دارویی در درمان سرطان محسوب می‌شوند (۱۴).

میکروRNAها (microRNA) به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی پس از رونویسی، در تعدیل اتوفاژی و چرخه سلولی دخیل هستند. *miR-146a* که نقش سرکوب‌کننده تومور دارد اغلب در سرطان پروستات (به‌ویژه نوع مقاوم به آندروژن) کاهش می‌یابد (۱۵). همچنین، *miR-22* نیز که نقش سرکوب‌کننده دارد در سرطان پروستات کاهش می‌یابد (۱۶). این *miRNA* نیز می‌تواند اتوفاژی را مهار کند (مانند آنچه در سرطان کولورکتال گزارش شده) و بیان ژن‌های مرتبط با چرخه‌ی سلولی (از جمله اعضای *cistrome* گیرنده آندروژن) را مهار نماید (۱۷،۱۸). مطالعات نشان داده‌اند میکروRNAها پتانسیل بالایی به‌عنوان نشانگر زیستی، اهداف درمانی یا عوامل افزایش‌دهنده پاسخ‌درمانی از خود نشان می‌دهند و درمان‌های هورمونی یا طبیعی (مانند ترکیبات گیاهی) می‌تواند با تعدیل بیان آن‌ها در درمان سرطان مفید باشد (۱۹).

با توجه به این‌که تاموکسیفن نیز در مطالعات پیشین بر بیان *miRNA*های مرتبط با سرطان و مسیرهای آپوپتوزیس و چرخه سلولی تأثیرگذار بوده است (۲۰،۲۱)، مقایسه همزمان اثر پاپاورین با تاموکسیفن می‌تواند درک عمیق‌تری از پتانسیل درمانی پاپاورین فراهم کند. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه اثرات ضدتوموری پاپاورین و تاموکسیفن بر بیان ژن *CDK4*، *miR-146a* و *miR-22* در رده سلولی *Du145* سرطان پروستات طراحی شد. در این مطالعه، تغییرات بیان این نشانگرهای مولکولی پس از تیمار با غلظت IC50 هر دو ترکیب با استفاده از Real-time PCR ارزیابی و مقایسه شد تا نقش احتمالی پاپاورین به‌عنوان یک عامل طبیعی با پتانسیل درمانی در سرطان پروستات روشن‌تر شود.

۲- مواد و روش‌ها

کشت سلول و گروه‌بندی: رده‌ی سلولی سرطان پروستات انسانی (DU145) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، تهران تهیه شد. ویال‌های منجمد حاوی سلول‌ها روی یخ خشک منتقل و تا زمان انجام آزمایش در ازلت مایع (-196°C) نگهداری شدند. برای آغاز کشت، ویال‌ها به‌سرعت در حمام آب گرم (37°C درجه سانتی‌گراد) ذوب، سلول‌ها سانتریفیوژ و رسوب سلولی در محیط کشت تازه سوسپانسیون شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum)، پنی‌سیلین (100 U/ml) و استرپتومایسین ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) کشت داده شدند و در انکوباتور با شرایط ۵ درصد، CO_2 و 37°C درجه سانتی‌گراد و رطوبت اشباع نگهداری شدند. محیط کشت هر دو روز یک‌بار تعویض شد.

غلظت‌یابی به‌منظور یافتن IC_{50} : برای ارزیابی زنده‌مانی سلولی و یافتن IC_{50} ، سنجش $[3-[4,5\text{-dimethylthiazol-2-yl}]-2,5]$ ، MTT (Sigma-Aldrich, USA) diphenyl tetrazolium bromide انجام شد. سلول‌های DU145 با تراکم 1×10^4 سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت شدند. سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند: (۱) گروه کنترل (بدون تیمار)، (۲) گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف پاپاورین ($6/25\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $12/5$ ، 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 400 ، 800 و 1600) و (۳) (گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف تاموکسیفن ($6/25\text{ }\mu\text{g/ml}$ ، $12/5$ ، 25 ، 50 ، 100 ، 200 ، 400 ، 800 و 1600) به مدت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت.

پس از پایان زمان تیمار، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور 37°C درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محیط کشت تخلیه شده و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از الیزا ریدر (DANA-3200) اندازه‌گیری گردید و درصد زنده‌مانی سلولی نسبت به گروه کنترل محاسبه شد. پس از محاسبه درصد زنده‌مانی، غلظتی از عصاره پاپاورین و تاموکسیفن که منجر به کاهش زنده‌مانی سلول‌ها تا ۵۰ درصد شد، به‌عنوان IC_{50} تعیین گردید. این غلظت‌ها برای انجام آزمایش‌های Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. پاپاورین و تاموکسیفن از شرکت Sigma-Aldrich (USA) تهیه شدند. ابتدا ترکیبات در DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شده و سپس با آب مقطر استریل به غلظت‌های موردنظر رقیق شدند. برای حذف اثر احتمالی حلال، غلظت نهایی DMSO مورد استفاده در تیمارهای دارویی به گروه کنترل نیز اضافه شد.

ارزیابی بیان ژن $CDK4$ ، $miR-146a$ و $miR-22$ با استفاده از Real time-qPCR : به‌منظور بررسی بیان کمی ژن $CDK4$ ، $miR-146a$ و $miR-22$ RNA کل از سلول‌های DU145 تیمار شده با غلظت IC_{50} پاپاورین و تاموکسیفن (به مدت ۲۴ ساعت) و همچنین گروه کنترل استخراج شد. استخراج RNA با استفاده از کیت Super RNA Extraction (Akuteb, Tehran, Iran) و مطابق دستورالعمل سازنده انجام گرفت. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با DNase I تیمار شدند. کیفیت و غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (BERTHOLD، آلمان) ارزیابی شد و نمونه‌های RNA با خلوص مناسب برای مراحل بعدی انتخاب شد.

سنتز cDNA از RNA کل با استفاده از کیت BioFact cDNA Synthesis Kit (BioFact, Korea) انجام شد. برای ژن $CDK4$ از ترکیب پرایمرهای Oligo(dT) و هگزامر تصادفی استفاده گردید. سنتز cDNA مربوط به miRNA ها مطابق دستورالعمل کیت و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی miRNA انجام شد. نمونه‌های cDNA تا زمان انجام واکنش Real-Time PCR در دمای 20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آنالیز بیان ژن $CDK4$ و $miR-146a$ و $miR-22$ با استفاده از روش Real-Time PCR مبتنی بر SYBR Green و دستگاه ABI StepOne (Applied Biosystems, USA) انجام شد. پرایمرهای اختصاصی در جدول ۱ آمده است. ژن گلیسر آلدهید-۳ فسفات

دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان ژن مرجع برای ژن *CDK4* و U6 snRNA به‌عنوان کنترل داخلی برای *miRNA*ها مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار انجام و مقادیر CT برای ژن‌های هدف و ژن‌های مرجع ثبت شده و تغییرات بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Fold change محاسبه شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

Target genes	Sequence (5'-to-3')
miR-22	F: GTTCTTCAGTGGCAAGC R: GAACATGTCTGCGTATCTC
miR-146a	F: GCTCACTGCAACCTCCAA R: TGTCCCAGCCCTGTAAAA
CDK4	F: CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT R: TCAGTTCGGGATGTGGCACAGA
GAPDH	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTC-3'
U6 snRNA	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT

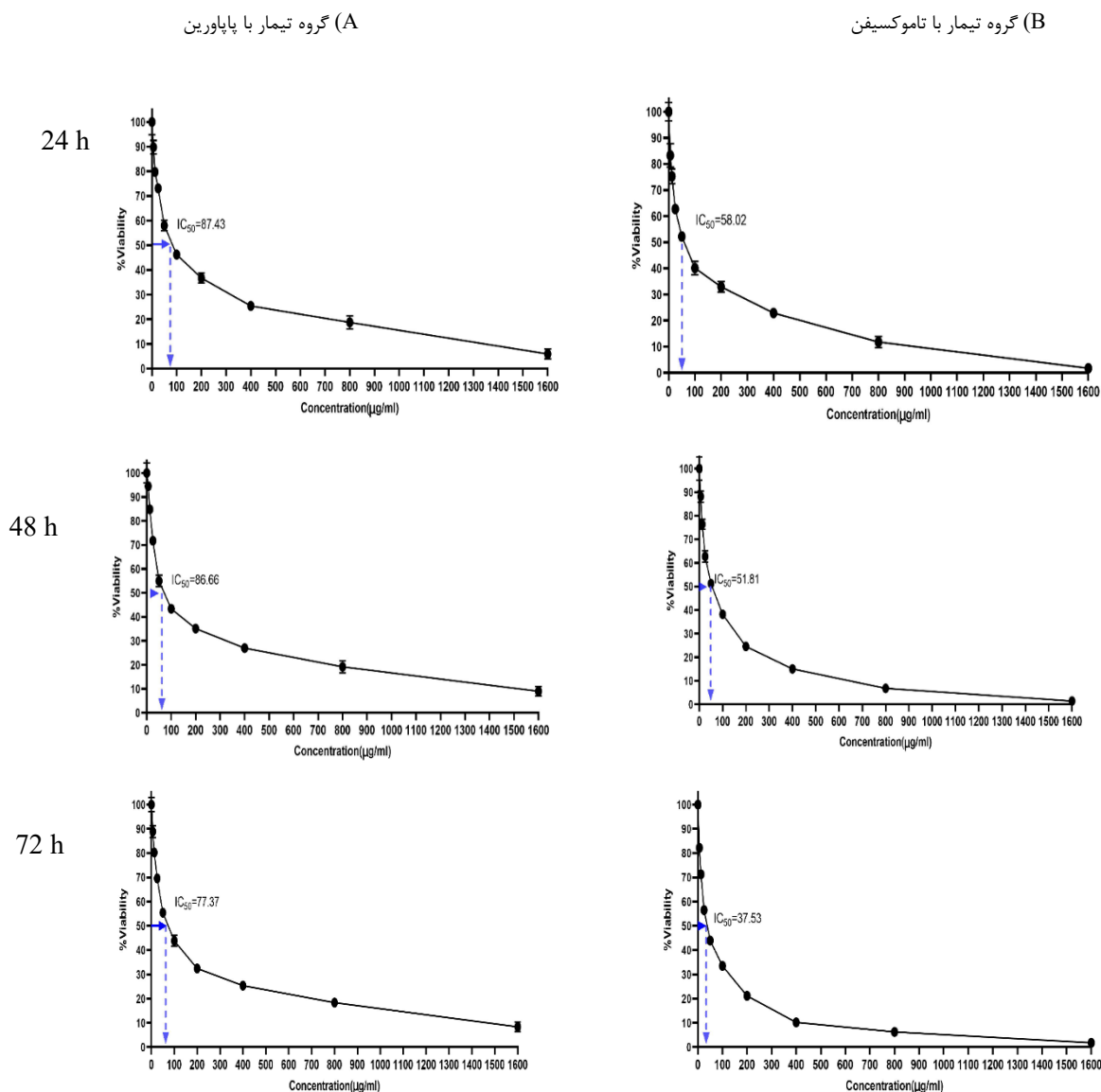
۳- آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند. ارزیابی داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی توکی (Tukey's test) نتایج به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند و مقدار $p \leq 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. برای هر آزمایش حداقل سه تکرار مستقل انجام شد تا دقت و قابلیت اطمینان نتایج تضمین شود.

۴- نتایج

ارزیابی اثرات پاپاورین و تاموکسیفن بر زنده‌مانی سلول‌های *DUI45*

اثر پاپاورین و تاموکسیفن روی بقای سلولی با سنجش MTT پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بررسی شد. نتایج نشان داد که هر دو دارو، اثر سیتوتوکسیک وابسته به غلظت و زمان داشتند؛ به‌طوری‌که افزایش غلظت و مدت زمان تیمار، منجر به کاهش بیشتر زنده‌مانی سلول‌ها شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (IC_{50}) برای پاپاورین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب $87/43$ ، $86/66$ و $77/37$ به‌دست آمد (شکل ۱A). برای تاموکسیفن در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب $58/02$ ، $51/81$ و $37/53$ بود (شکل ۱B). بر اساس این نتایج مشخص شد که تاموکسیفن سمیت سلولی قوی‌تری نسبت به پاپاورین دارد و بیشترین اثر آن در ۷۲ ساعت مشاهده شد.

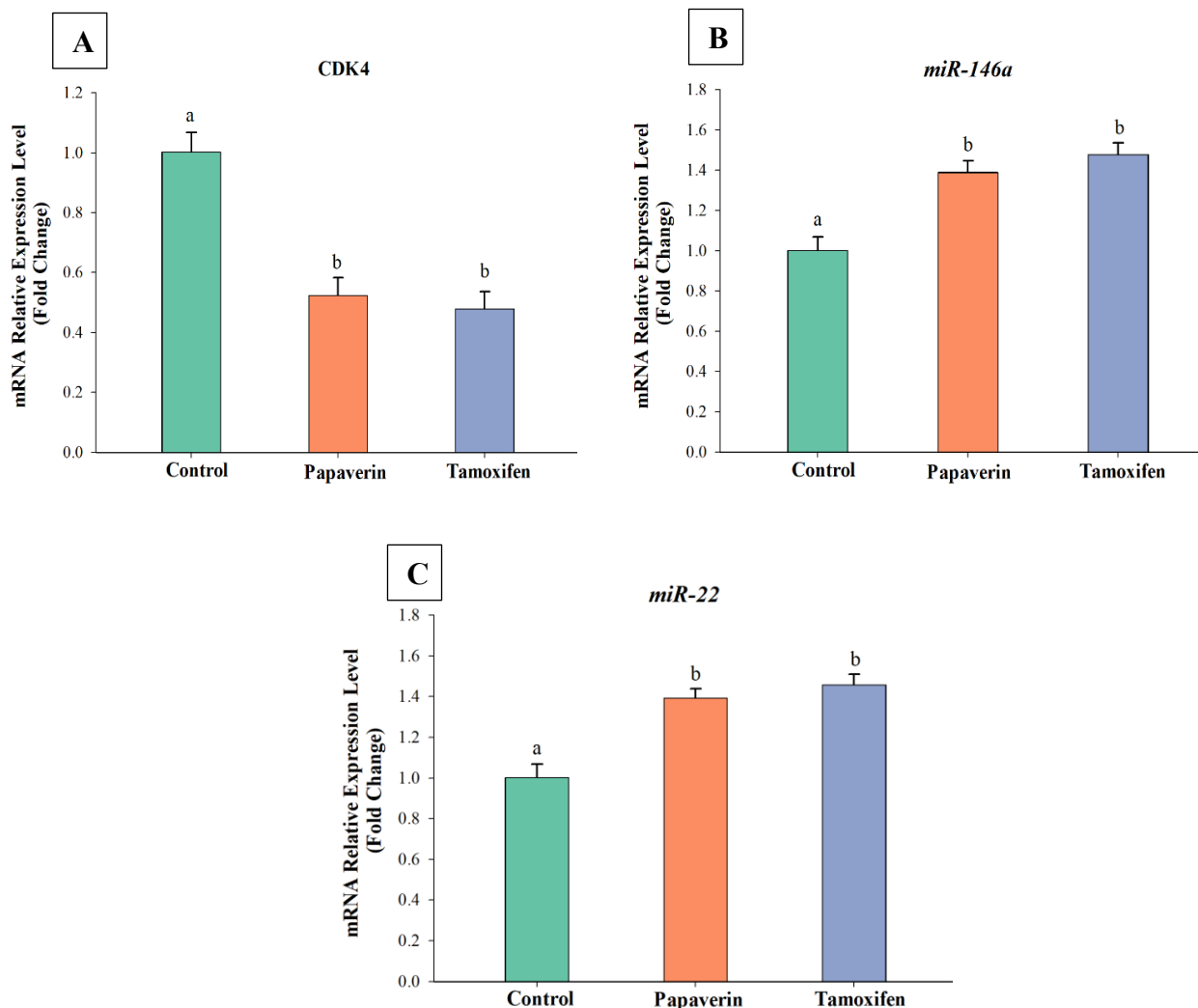


شکل ۱: بررسی اثر سایتوتوکسیک داروهای پاپاورین (A) و تاموکسیفن (B) به وسیله سنجش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار بر روی رده سلولی DU145. براساس حداقل غلظت مهارکنندگی (IC₅₀), هر دو دارو اثرات سایتوتوکسیک وابسته به غلظت و زمان را نشان دادند.

ارزیابی اثرات پاپاورین و تاموکسیفن بر بیان ژن *CDK4* و *microRNA* های *miR-22* و *miR-146a*

نتایج RT-qPCR نشان داد که سطح بیان ژن *CDK4* در سلول‌های DU145 در گروه تیمار شده با پاپاورین نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) کاهش یافت. تیمار این سلول‌ها با تاموکسیفن نیز منجر به کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.01$) بیان ژن *CDK4* در مقایسه با گروه کنترل شد (شکل ۲A).

همچنین، بیان *miR-146a* (شکل ۲B) و *miR-22* (شکل ۲C) در گروه تیمار با پاپاورین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p \leq 0.001$) نشان دادند. در گروه تیمار با تاموکسیفن نیز بیان *miR-146a* و *miR-22* در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.001$) افزایش یافت.



شکل ۲: مقایسه میانگین بیان ژن *CDK4* (A)، *miR-146a* (B) و *miR-22* (C) در گروه‌های کنترل، تیمار با پاپاورین و تاموکسیفن. ژن‌های *CDK4* در برابر ژن *GAPDH* و *miR-146a* و *miR-22* در برابر *U6 snRNA* نرمال شدند و نتایج به‌صورت Fold change نسبت به گروه کنترل محاسبه گردید. مقادیر به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ ارائه شده‌اند. میانگین با کد حرف‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند. (تعداد تکرار ۳ بار در هر گروه، آنالیز واریانس یکطرفه، تست توکی (Tukey's test))

۵- بحث

سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در مردان است و شناسایی ترکیباتی که بتوانند تکثیر سلول‌های سرطانی را مهار کنند، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. در مطالعه حاضر، اثر تاموکسیفن و پاپاورین بر زنده‌مانی سلولی، بیان ژن *CDK4* و بیان microRNA‌های مرتبط با چرخه سلولی در رده سلولی سرطان پروستات DU145 بررسی شد. نتایج نشان داد که هر دو ترکیب باعث کاهش وابسته به دوز و زمان در بقای سلول‌های DU145 شدند، به‌طوری‌که تاموکسیفن نسبت به پاپاورین اثر سیتوتوکسیک قوی‌تری

نشان داد و بیشترین کاهش زنده‌مانی در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد. این یافته با نتایج مطالعات پیشین هم‌خوانی دارد که نشان داده‌اند تاموکسیفن از طریق مهار پروتئین کیناز C (PKC)، افزایش بیان مهارکننده‌های چرخه سلولی مانند p21 و مهار مسیرهای سیگنالینگ ERK1/2 و AKT موجب توقف چرخه سلولی و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۲، ۲۳). همچنین گزارش شده است که تاموکسیفن می‌تواند از طریق مهار مسیر PI3K/AKT و کاهش سیگنال‌های بقا، رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند (۲۳). مطالعات دیگر نشان دادند که تاموکسیفن علاوه بر اثرات وابسته به گیرنده استروژن، می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تکثیر سلولی را در سلول‌های سرطان پروستات تنظیم کند (۲۴-۲۶). در مقابل، پاپاورین یک آلکالوئید مشتق از گیاه خشخاش است که عمدتاً به‌عنوان مهارکننده فسفودی‌استراز شناخته می‌شود. مهار فسفودی‌استراز توسط پاپاورین منجر به افزایش سطح cAMP داخل سلولی شده و در نتیجه مسیر سیگنالینگ cAMP/PKA فعال می‌شود (۲۷). فعال شدن این مسیر می‌تواند با تغییر فعالیت فاکتورهای رونویسی مختلف از جمله CREB، بیان ژن‌های مرتبط با بقا، تکثیر و آپوپتوزیس را تنظیم کند (۲۸). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که افزایش cAMP می‌تواند موجب مهار مسیرهای سیگنالینگ تکثیری مانند PI3K/Akt و MAPK شود و در نتیجه رشد سلول‌های سرطانی را کاهش دهد (۲۹). در مطالعه‌ای توسط Gomes و همکاران (۳۰) نشان داده شد که پاپاورین قادر است تکثیر رده‌های سلولی مختلف از جمله MDA-MB-231، A549 و DU145 را مهار کند. علاوه بر این، Benej و همکاران (۳۱) گزارش کردند که پاپاورین با مهار کمپلکس I میتوکندریایی موجب کاهش مصرف اکسیژن سلولی شده و می‌تواند مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی را مهار کند. همچنین در مطالعه‌ای توسط Huang و همکاران (۱۱) نشان داده شد که اختلال در متابولیسم میتوکندریایی ناشی از پاپاورین می‌تواند باعث کاهش تولید ATP و افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی به آپوپتوزیس شود. از سوی دیگر، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد پاپاورین می‌تواند فعالیت تلومراز را نیز مهار کند. تلومراز یکی از عوامل مهم در حفظ ظرفیت تکثیری سلول‌های سرطانی است و مهار آن می‌تواند منجر به محدود شدن توان تکثیر و القای مرگ سلولی شود. Nourini و همکاران (۳۲) نشان دادند که پاپاورین قادر است فعالیت تلومراز را در سلول‌های HepG2 مهار کند. علاوه بر این، گزارش شده است که برخی آلکالوئیدهای مشابه پاپاورین می‌توانند با مهار تلومراز و مسیر NF-κB موجب کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شوند. از آن‌جا که فعال بودن مسیر NF-κB و افزایش فعالیت تلومراز از ویژگی‌های بسیاری از تومورها از جمله رده سلولی DU145 محسوب می‌شود، مهار این مسیرها توسط پاپاورین می‌تواند نقش مهمی در مهار پیشرفت تومور داشته باشد (۳۳).

یکی از یافته‌های مهم این مطالعه کاهش معنی‌دار بیان ژن *CDK4* پس از تیمار با پاپاورین و تاموکسیفن بود. ژن *CDK4* یکی از کینازهای کلیدی در تنظیم چرخه سلولی است که با تشکیل کمپلکس با Cyclin D موجب فسفریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما و عبور سلول از فاز G1 به فاز S می‌شود (۳۴). بنابراین کاهش بیان این ژن می‌تواند منجر به توقف چرخه سلولی در مرحله G1 و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی شود. مطالعات پیشین نیز اهمیت این مسیر را در پاسخ سلول‌های سرطانی به درمان‌های دارویی نشان داده‌اند. برای مثال Gao و همکاران (۳۵) گزارش کردند که کاهش بیان *CDK4* و *CDK1* می‌تواند حساسیت سلول‌های مقاوم به تاموکسیفن را افزایش دهد. علاوه بر این، مطالعات متعددی نشان دادند که ترکیبات طبیعی مختلف می‌توانند از طریق مهار بیان ژن *CDK4* موجب توقف چرخه سلولی در انواع سرطان‌ها باشد (۳۶-۳۸).

علاوه بر تغییرات در بیان ژن‌ها، microRNAها نیز نقش مهمی در تنظیم پاسخ سلول‌های سرطانی به ترکیبات دارویی دارند. microRNAها مولکول‌های RNA کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که با اتصال به ناحیه 3'UTR mRNAها موجب مهار ترجمه یا تخریب آن‌ها می‌شوند و از این طریق بیان ژن‌های مختلف دخیل در تکثیر، آپوپتوزیس و متاستاز را تنظیم می‌کنند. در سال‌های اخیر مشخص شده است که بسیاری از ترکیبات ضدسرطان با تغییر الگوی بیان microRNAها اثرات بیولوژیکی خود را اعمال می‌کنند و این تغییرات می‌تواند در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ کلیدی در سلول‌های توموری نقش داشته باشد (۳۹).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که بیان miR-22 پس از تیمار با پاپاورین و تاموکسیفن افزایش یافت. miR-22 یکی از microRNAهای سرکوبگر تومور محسوب می‌شود که در بسیاری از سرطان‌ها کاهش بیان آن گزارش شده است. این microRNA قادر است ژن‌های

مختلف دخیل در پیشرفت چرخه سلولی و مسیرهای سیگنالینگ تکثیری را هدف قرار دهد (۴۲-۴۰). مطالعات نشان داده‌اند که *miR-22* با مهار مسیر *PI3K/AKT* و کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با تکثیر سلولی می‌تواند رشد تومور را مهار کند (۴۳). برای مثال Wang و همکاران (۴۴) گزارش کردند که افزایش بیان *miR-22* موجب مهار مسیر *PI3K/AKT* و کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین *miR-22* با هدف قرار دادن ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی از جمله *Cyclin E* و *CDK6* می‌تواند موجب توقف چرخه سلولی و کاهش رشد تومور شود (۴۵،۴۶). بنابراین افزایش بیان *miR-22* در این مطالعه می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مولکولی کاهش تکثیر سلول‌های *DU145* باشد. از سوی دیگر، *miR-146a* یکی از *microRNA*های مهم در تنظیم پاسخ‌های التهابی و مسیر *NF-κB* محسوب می‌شود. این *microRNA* با هدف قرار دادن مولکول‌های بالادست مسیر *NF-κB* از جمله *IRAK1* و *TRAF6* موجب مهار فعال‌سازی این مسیر سیگنالینگ می‌شود و در نتیجه بیان سایتوکاین‌های التهابی و فاکتورهای پروموتور تومور کاهش می‌یابد (۴۷). Meng و همکاران (۴۸) نشان دادند که *miR-146a* یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی مسیر *NF-κB* است و افزایش بیان آن می‌تواند التهاب مزمن و پیشرفت تومور را مهار کند. علاوه بر این، Sun و همکاران (۱۵) گزارش کردند که افزایش *miR-146a* در سرطان پروستات موجب کاهش مهاجرت و تهاجم سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد که پاپاورین علاوه بر اثر مستقیم بر مسیرهای سیگنالینگ، از طریق تنظیم اپی‌ژنتیکی بیان *microRNA*ها نیز اثرات ضدسرطانی خود را اعمال می‌کند. افزایش *cAMP* ناشی از مهار فسفودی‌استراز می‌تواند از طریق فعال‌سازی مسیر *cAMP/PKA* فعالیت فاکتورهای رونویسی مانند *CREB* را تغییر دهد و در نتیجه بیان برخی *microRNA*های سرکوبگر تومور از جمله *miR-22* و *miR-146a* افزایش یابد. این *microRNA*ها با هدف قرار دادن ژن‌ها و مسیرهای سیگنالینگ کلیدی از جمله *PI3K/AKT* و *NF-κB* می‌توانند موجب مهار تکثیر سلولی، کاهش التهاب توموری و افزایش آپوپتوزیس شوند. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش سطح *cAMP* می‌تواند بیان *microRNA*های ضدتکثیری را تقویت کرده و در نهایت منجر به مهار مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با رشد تومور شود (۴۹،۵۰).

با وجود این که تاموکسیفن در این مطالعه اثر سیتوتوکسیک قوی‌تری نشان داد، پاپاورین دارای برخی مزایای بالقوه است که می‌تواند آن را به‌عنوان یک ترکیب مکمل در درمان سرطان مطرح کند. پاپاورین با هدف قرار دادن مسیرهای متعددی از جمله افزایش *cAMP*، مهار *NF-κB*، مهار تلومرآز، کاهش بیان ژن *CDK4* و تنظیم بیان *microRNA*های سرکوبگر تومور می‌تواند به‌طور هم‌زمان چندین مسیر مولکولی مرتبط با پیشرفت سرطان را مهار کند. علاوه بر این، به دلیل ماهیت آلوئیدی و استفاده طولانی‌مدت از این ترکیب در کاربردهای دارویی دیگر، پاپاورین معمولاً دارای پروفایل ایمنی مناسب‌تری نسبت به بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی از جمله تاموکسیفن است. داروهای شیمی‌درمانی اغلب با عوارض جانبی شدید، سمیت سیستمیک و ایجاد مقاومت دارویی همراه هستند؛ در حالی که ترکیباتی مانند پاپاورین می‌توانند با هدف قرار دادن مسیرهای مولکولی متفاوت، اثرات هم‌افزا با سایر درمان‌ها ایجاد کنند و در عین حال سمیت کم‌تری داشته باشند. بنابراین بررسی بیشتر این ترکیب در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی می‌تواند به توسعه رویکردهای درمانی جدید و مؤثرتر برای سرطان پروستات کمک کند.

۶- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اگرچه تاموکسیفن در مقایسه با پاپاورین اثر سیتوتوکسیک قوی‌تری بر سلول‌های *DU145* دارد، اما پاپاورین نیز می‌تواند از طریق القای توقف چرخه سلولی و تحریک فرآیندهای آپوپتوزیس، در نهایت منجر به مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی شود. وجود چنین مکانیسم‌های چندهدفه نشان می‌دهد که پاپاورین قادر است هم‌زمان چندین مسیر کلیدی دخیل در پیشرفت تومور را تحت تأثیر قرار دهد. با توجه به این که بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی متداول با محدودیت‌هایی مانند سمیت بالا، بروز عوارض جانبی شدید، ایجاد مقاومت دارویی و هزینه‌های درمانی قابل توجه همراه هستند، توجه به ترکیبات طبیعی با اثرات چندگانه و ایمنی نسبی بیشتر اهمیت یافته است. در این راستا، پاپاورین به‌عنوان یک آلوئید طبیعی با توانایی تنظیم مسیرهای مولکولی مرتبط با تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی می‌تواند به‌عنوان یک گزینه بالقوه در درمان‌های کمکی یا ترکیبی سرطان پروستات مورد توجه قرار گیرد. با

این حال، برای تأیید اثربخشی و ایمنی بالینی آن، انجام مطالعات بیشتر در مدل‌های آزمایشگاهی پیشرفته‌تر و کارآزمایی‌های بالینی ضروری به نظر می‌رسد.

۷- تشکر و قدردانی

این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه اراک به انجام رسید.

۸- منابع

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
3. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*. 2010;24(18):1967–2000.
4. Crawford ED, Heidenreich A, Lawrentschuk N, Tombal B, et al. Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2019;22(1):24–38.
5. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract*. 2011;65(11):1180–92.
6. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG guidelines on prostate cancer—2020 update. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. *Eur Urol*. 2021;79(2):243–62.
7. El Etreby MF, Liang Y, Lewis RW. Induction of apoptosis by mifepristone and tamoxifen in human LNCaP prostate cancer cells in culture. *Prostate*. 2000;43(1):31–42.
8. Mimeault M, Venkatraman G, Johansson SL, Moore E, et al. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. *Int J cancer*. 2007;120(1):160–9.
9. Ali S, Rasool M, Chaoudhry H, Pushparaj PN, et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation*. 2016;12(3):135.
10. Goto T, Matsushima H, Kasuya Y, Hosaka Y, et al. The effect of papaverine on morphologic differentiation, proliferation and invasive potential of human prostatic cancer LNCaP cells. *Int J Urol*. 1999;6(6):314–9.
11. Huang H, Li L-J, Zhang H-B, Wei A-Y. Papaverine selectively inhibits human prostate cancer cell (PC-3) growth by inducing mitochondrial mediated apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of NF- κ B/PI3K/Akt signalling pathway. *J BUON*. 2017;22(1):112–8.
12. Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1770–83.
13. Lu S, Tsai SY, Tsai M-J. Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res*. 1997;57(20):4511–6.
14. Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, Combest AJ, et al. Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(6):476–87.
15. Sun Q, Zhao X, Liu X, Wang Y, et al. miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate*. 2014;74(16):1613–21.

16. Lin S-L, Chiang A, Chang D, Ying S-Y. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *Rna*. 2008;14(3):417–24.
17. Xin M, Qiao Z, Li J, Liu J, et al. miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(28):44252.
18. Pasqualini L, Bu H, Puhf M, Narisu N, et al. miR-22 and miR-29a are members of the androgen receptor cistrome modulating LAMC1 and Mcl-1 in prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2015;29(7):1037–54.
19. Gezici S, Sekeroglu N. Regulation of microRNAs by natural products and bioactive compounds obtained from common medicinal plants: novel strategy in cancer therapy. *Cancer*. 2017;1(4):71.
20. Zhao Y, Deng C, Lu W, Xiao J, et al. let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor α signaling in breast cancer. *Mol Med*. 2011;17(11–12):1233–41.
21. Raha P, Thomas S, Thurn KT, Park J, et al. Combined histone deacetylase inhibition and tamoxifen induces apoptosis in tamoxifen-resistant breast cancer models, by reversing Bcl-2 overexpression. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):26.
22. Li Z, Wang NA, Fang J, Huang J, et al. Role of PKC-ERK signaling in tamoxifen-induced apoptosis and tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Oncol Rep*. 2012;27(6):1879–86.
23. Chen X, Zhao M, Hao M, Sun X, et al. Dual inhibition of PI3K and mTOR mitigates compensatory AKT activation and improves tamoxifen response in breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2013;11(10):1269–78.
24. Pienta KJ, Replogle T, Lehr JE. Inhibition of prostate cancer growth by vinblastine and tamoxifen. *Prostate*. 1995;26(5):270–4.
25. Rohlff C, Blagosklonny M V, Kyle E, Kesari A, et al. Prostate cancer cell growth inhibition by tamoxifen is associated with inhibition of protein kinase C and induction of p21waf1/cip1. *Prostate*. 1998;37(1):51–9.
26. Kunath F, Keck B, Antes G, Wullich B, et al. Tamoxifen for the management of breast events induced by non-steroidal antiandrogens in patients with prostate cancer: a systematic review. *BMC Med*. 2012;10(1):96.
27. Yildiz N, Gokkaya NKO, Koseoglu F, Gokkaya S, et al. Efficacies of papaverine and sildenafil in the treatment of erectile dysfunction in early-stage paraplegic men. *Int J Rehabil Res*. 2011;34(1):44–52.
28. Nasibyan LS, Philyppov IB. Effect of Staphylococcus aureus Cell-Wall Peptidoglycan on the Rat Myometrial Contractility Regulation by Adenylate Cyclase Signaling System. *Int J Physiol Pathophysiol*. 2017;8(1).
29. Morgos D-T, Stefani C, Miricescu D, Greabu M, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways in gastric cancer. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1848.
30. Gomes DA, Joubert AM, Visagie MH. In vitro effects of papaverine on cell proliferation, reactive oxygen species, and cell cycle progression in cancer cells. *Molecules*. 2021;26(21):6388.
31. Benej M, Hong X, Vibhute S, Scott S, et al. Papaverine and its derivatives radiosensitize solid tumors by inhibiting mitochondrial metabolism. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(42):10756–61.
32. Noureini SK, Wink M. Antiproliferative effect of the isoquinoline alkaloid papaverine in hepatocarcinoma HepG-2 cells—Inhibition of telomerase and induction of senescence. *Molecules*. 2014;19(8):11846–59.
33. Gomes DA, Joubert AM, Visagie MH. The biological relevance of papaverine in cancer cells. *Cells*. 2022;11(21):3385.
34. Lukas J, Bartkova J, Rohde M, Strauss M, et al. Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol*. 1995;15(5):2600–11.
35. Gao A, Sun T, Ma G, Cao J, et al. LEM4 confers tamoxifen resistance to breast cancer cells by activating cyclin D-CDK4/6-Rb and ER α pathway. *Nat Commun*. 2018;9(1):4180.

36. Ashraf MA, Sayed S, Bello M, Hussain N, et al. CDK4 as a phytochemical based anticancer drug target. *Informatics Med Unlocked*. 2022;28:100826.
37. Soni R, Muller L, Furet P, Schoepfer J, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) by fascaplysin, a marine natural product. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(3):877–84.
38. Park GH, Sung JH, Song HM, Jeong JB. Anti-cancer activity of *Psoralea fructus* through the downregulation of cyclin D1 and CDK4 in human colorectal cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):373.
39. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds J V. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev*. 2009;84(1):55–71.
40. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, et al. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011;193(2):409–24.
41. Li J, Liang S, Yu H, Zhang J, et al. An inhibitory effect of miR-22 on cell migration and invasion in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;119(3):543–8.
42. Song SJ, Pandolfi PP. miR-22 in tumorigenesis. *Cell cycle*. 2014;13(1):11–2.
43. Wu H, Liu J, Zhang Y, Li Q, et al. KT signaling pathway. *Clin Transl Oncol*. 2021;23(2):257–64.
44. Wang Y, Lin C. Exosomes miR-22-3p derived from mesenchymal stem cells suppress colorectal cancer cell proliferation and invasion by regulating RAP2B and PI3K/AKT pathway. *J Oncol*. 2021;2021(1):3874478.
45. Zhang X, Yang L, Huang B, Yin J, et al. Identification and validation of cyclin A2 and cyclin E2 as potential biomarkers in small cell lung cancer. *Oncol Res Treat*. 2023;46(6):246–58.
46. Xia B, Yang S, Liu T, Lou G. miR-211 suppresses epithelial ovarian cancer proliferation and cell-cycle progression by targeting Cyclin D1 and CDK6. *Mol Cancer*. 2015;14(1):57.
47. Shao J, Ding Z, Peng J, Zhou R, et al. MiR-146a-5p promotes IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis through the TRAF6-mediated NF-kB pathway. *Inflamm Res*. 2020;69(6):619–30.
48. Meng Q, Liang C, Hua J, Zhang B, et al. A miR-146a-5p/TRAF6/NF-kB p65 axis regulates pancreatic cancer chemoresistance: functional validation and clinical significance. *Theranostics*. 2020;10(9):3967.
49. Yang Z, Tsuchiya H, Zhang Y, Hartnett ME, et al. MicroRNA-433 inhibits liver cancer cell migration by repressing the protein expression and function of cAMP response element-binding protein. *J Biol Chem*. 2013;288(40):28893–9.
50. Keller DM, Clark EA, Goodman RH. Regulation of microRNA-375 by cAMP in pancreatic β -cells. *Mol Endocrinol*. 2012;26(6):989–99.