Original Article

Study of cell proliferation and migration inhibition by miR-4516 treatment in human breast cancer

Aliasghari-Renani R, Doosti Z, Reiisi S*

Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 2020/01/6 | Accepted: 2020/10/19

Abstract:

Background: Breast cancer is the most common cancer among women. Studies have displayed that the dysregulation of microRNAs (miRNAs) plays a crucial role in the incidence, progress, and metastasis of tumors. miRNAs have been considered as a biomarker as well as a therapeutic agent, thus gene therapy with miRNA is considered as one of the ways to treat cancer. miR-4516 has been reported to play a role in different diseases and malignancies. However, the expression level and biological function of miR-4516 in breast cancer remain poorly understood. This study aimed to investigate the expression level and the effect of miR-4516 on the proliferation and migration in breast cancer.

Material and Methods: Tumor and adjacent non-tumor tissues were collected from 40 patients with breast cancer. MiR-4516 levels in breast cancer cell lines and tumor tissue were measured by real-time PCR. Pre-mir-4516 was cloned in the pEGFPN1 vector. Then human breast cancer MCF7 cells were cultured and pre-miR-4516 vector and control vector were transfected into cells. After transfection, a miR-4516 level was verified by QPCR. Cell proliferation and migration were studied with MTT assay and scratch test respectively.

Results: miR-4516 was down-regulated in breast cancer tissues and cell lines. Low expression of miR-4516 was directly related to the high-grade tumor. miR-4516 suppressed breast cancer cell proliferation, but not migration in vitro.

Conclusions: miR-4516 may function as a tumor suppressor and inhibits the proliferation which may consequently serve as a therapeutic target for breast cancer.

Keywords: miR-4516, Breast cancer, Proliferation, Migration

***Corresponding Author**
Email: s.reiisi@yahoo.com
Tel: 0098 383 232 4410
Fax: 0098 383 232 4419

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2020; Vol. 24, No 5, Pages 499-507

Please cite this article as: Aliasghari-Renani R, Doosti Z, Reiisi S. Study of cell proliferation and migration inhibition by miR-4516 treatment in human breast cancer. ***Feyz*** 2020; 24(5): 499-507.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

بررسی مهار تکثیر و مهاجرت سلولی تحت تیمار miR-4516 در سرطان پستان انسانی

رؤیا علی‌عسگری رنانی[۱]، زهرا دوستی[۲]، سمیه رئیسی[۳*]

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان است. مطالعات نشان داده‌اند که تغییر در بیان miRNAها نقش حیاتی در وقوع، پیشرفت و متاستاز تومور دارد. miRNAها به‌عنوان بیومارکر و همچنین یک عامل درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند؛ بر همین اساس ژن‌درمانی با miRNA به‌عنوان یکی از راه‌های درمان سرطان به حساب می‌آید. گزارش شده است که miR-4516، نقشی را در بیماری‌ها و بدخیمی‌های مختلف بازی می‌کند. با این وجود، سطح بیانی و عملکرد بیولوژیکی miR-4516 در سرطان پستان به‌صورت بسیار ضعیف مشخص شده است. هدف این مطالعه، بررسی سطح بیان و اثر miR-4516 روی تکثیر و مهاجرت سلولی در سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها: بافت‌های توموری و غیرتوموری مجاور از ۴۰ بیمار دارای سرطان پستان جمع‌آوری شدند. سطح بیانی miR-4516 در رده‌های سلولی سرطان پستان و بافت‌های توموری توسط real-time PCR اندازه‌گیری شد. توالی پیش‌ساز miR-4516 در وکتور pEGFPN1 کلون شد. سپس سلول‌های سرطانی MCF7 کشت داده شدند و وکتور حاوی pre-miR-4516 و وکتور کنترل به سلول‌ها ترانسفکت شدند. بعد از ترانسفکشن، سطح miR-4516 به‌وسیله QPCR تأیید شد. تکثیر و مهاجرت سلولی به ترتیب توسط روش MTT و تست خراش مطالعه شدند.

نتایج: میزان بیان miR-4516 در بافت‌های توموری و رده‌های سلولی کاهش معنی‌داری نشان داد. کاهش بیان miR-4516 با درجه بالای تومور، ارتباط مستقیم دارد. miR-4516 سبب مهار تکثیر سلولی می‌شود، اما بر روی مهاجرت سلولی تأثیری ندارد.

نتیجه‌گیری: miR-4516 ممکن است به‌عنوان مهارکننده تومور عمل کند و تکثیر سلولی را مهار نماید و درنتیجه می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی برای سرطان پستان مدنظر باشد.

واژگان کلیدی: miR-4516، سرطان پستان، تکثیر سلولی، مهاجرت

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۵، آذر - دی ۱۳۹۹، صفحات ۵۰۷-۴۹۹

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان در سرتاسر جهان است و گرچه میزان مرگ‌ومیر رو به کاهش است، اما در بین شایع‌ترین دلایل مرگ‌ومیر سرطان در زنان، در رده دوم قرار دارد [۱]. مدیریت مؤثر سرطان پستان، بستگی به تشخیص و نظارت بر پاسخ بیمار نسبت به درمان دارد که این امر نیازمند وجود بیومارکرهای تشخیصی مناسب است. در این میان miRNAها به‌عنوان بیومارکر و همچنین یک عامل درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲]؛ بر همین اساس ژن‌درمانی با miRNA به‌عنوان یکی از راه‌های درمان سرطان به حساب می‌آید.

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱ **دورنویس:** ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹

پست الکترونیک: s.reiisi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۷/۲۸

miRNAها، یک گروه از RNAهای کوچک غیرکدکننده با طول ۲۵-۱۸ نوکلئوتید هستند که در دهه اخیر در بسیاری از تحقیقات بیولوژیکی و پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند. miRNAها نقش عمده‌ای در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای تکوینی، از جمله متابولیسم، تکثیر سلولی، آپوپتوز، تمایز، زمان‌بندی تکوین و سرنوشت سلول‌های عصبی بازی می‌کنند [۳]. تا به امروز بیش از ۱۹۰۰ miRNA در انسان کشف شده است که بسیاری از آن‌ها در ناهنجاری‌های مربوط به انسان، از جمله سرطان درگیر هستند [۴]. miRNAها بیان ژن را با اتصال به توالی مکمل در ناحیه 3'UTR مربوط به mRNAها مهار می‌کنند تا آن‌ها را برای تخریب و هدف‌گیری، آماده و یا از ترجمه آن‌ها جلوگیری کنند [۵]. هر miRNA می‌تواند صدها یا هزاران mRNAی مختلف را هدف قرار دهد و هر mRNA هدف می‌تواند به‌صورت هماهنگ به‌وسیله miRNAهای مختلف مهار شود. بنابراین مسیر سنتز miRNA، نقش مهمی در شبکه‌های تنظیم بیان ژن دارد [۶]. miRNAها در ابتدا به‌صورت pri-miRNA رونویسی می‌شوند. pri-miRNA داخل هسته به‌وسیله Dorsha به پیش‌ساز miRNA (pre-miRNA)، پردازش می‌شود [۷]. miRNA

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

ایجادشده در این‌جا یک ساختار سنجاق‌سری با طول ۷۰-۶۰ نوکلئوتید دارد [۸]. سپس انتقال pre-miRNA به سیتوپلاسم به‌وسیله Exportin-5 میانجی‌گری می‌گردد [۷]. در سیتوپلاسم توسط آنزیم Dicer به یک miRNAی بالغ دو رشته‌ای به طول تقریباً ۲۲ نوکلئوتید تبدیل می‌شود [۹]. در نهایت به کمک کمپلکس خاموش‌کننده القاشده با RNA (RISC)، دو رشته miRNA از هم باز شده، به توالی mRNA ژن هدف در ناحیه 3'-UTR متصل می‌شوند [۱۰]. امروزه به‌خوبی ثابت شده است که در سرطان‌های مختلف انسانی، افزایش یا کاهش بیان miRNAها اتفاق می‌افتد. miRNAهای بیش از حد بیان‌شده ممکن است به‌عنوان آنکوژن (از طریق کاهش بیان ژن‌های سرکوب‌گر تومور) و یا تنظیم‌کننده فرآیندهای سلولی مانند تمایز سلولی یا آپوپتوز عمل کنند. پیش‌بینی شده است که miRNAها در آینده نزدیک، پتانسیل بالایی دارند برای این‌که در تشخیص و درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرند [۱۱]. اخیراً، miRNAها توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند. یکی از این miRNAهای حائز اهمیت، miR-4516 می‌باشد که داده‌های زیادی در رابطه با میزان بیان این miRNA در سرطان‌های مختلف و یا سایر بیماری‌ها در اختیار نیست. miR-4516 برای اوّلین‌بار در سال ۲۰۱۰ هنگام بررسی و مقایسه ترانسکریپتوم سلول‌های B نرمال و بدخیم شناسایی شد [۱۲]. بعد از آن در سال ۲۰۱۶ مشخص شد که این miR-4516 یکی از چندین miRNA موجود در ناحیه مربوط به DNA ریبوزومی است و بررسی RNAهای ریبوزومی، وجود این miRNA را تأیید کرد [۱۳]. با این وجود، تاکنون در مورد ارتباط miR-4516 با سرطان پستان اطلاعاتی یافت نشده است. در این مطالعه، میزان بیان miR4516 در لاین‌های سرطانی پستان و همچنین در نمونه‌های پارافینه سرطانی و بافت‌های سالم مجاور آن مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی عملکرد miR-4516، اثر آن بر روی تکثیر و مهاجرت سلولی سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه ابتدا در کمیته پژوهشی و اخلاق دانشگاه به شماره IR.SKU.REC.1398.005 مورد تأیید قرار گرفت و تمام موارد اخلاقی برای حفظ اطلاعات و ناشناس بودن افراد در نظر گرفته شد.

بررسی بیان miRNA در نمونه‌های بافتی و لاین‌های سلولی سرطان پستان

در مطالعه حاضر که مطالعه توصیفی - تحلیلی است، برای بررسی سطح بیانی miR-4516 از بافت‌های پارافینه سرطان پستان موجود در بخش پاتولوژی استفاده شد. بافت‌های پارافینه از بیمارستان آیت‌الله کاشانی شهرکرد در طی سال‌های ۱۳۹۶ الی ۱۳۹۷ تهیه و ۴۰ بافت توموری سرطان پستان و ۴۰ بافت غیرتوموری مجاور آن انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه، تأیید سرطان سینه در نمونه گرفته‌شده از خانم‌های دارای توده سینه‌ای توسط پاتولوژیست و عدم تکثیر سلولی در بافت مجاور بود. موارد توموری خوش‌خیم و توده‌ای از مطالعه حذف شدند. برای تهیه نمونه‌ها از بلوک‌های پارافینه، برش‌های ۱۰ میکرومتری جداسازی و در میکروتیوپ‌های ۲ سی‌سی استریل قرار داده شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. از تمام بیماران در دسترس، فرم رضایت‌نامه دریافت گردید و علاوه بر سن، اطلاعات پاتولوژی و بالینی بیماران نیز مانند اندازه تومور، متاستاز و درجه توموری برای هر نمونه با توجه به اطلاعات ثبت‌شده توسط متخصص پاتولوژیست، مشخص شد. لاین‌های سلولی برای مطالعه از مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه و مراحل کشت و آزمایشات مربوطه بر روی آن‌ها انجام شدند. RNA تام سلولی با استفاده از کیت استخراج NucleoSpin totalRNA FFPE- MN) Germany) و براساس دستورالعمل کیت انجام شد. مطابق با روش کیت، ابتدا پارافین‌زدایی و سپس سایر مراحل استخراج بر روی بافت بدون پارافین انجام شد. برای بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج‌شده، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. RNAهای به‌دست‌آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای استخراج RNA از لاین‌های سلولی سرطان پستان، به منظور بررسی بیان miRNA از محلول RNX-Plus استفاده شد و براساس دستورالعمل خالص‌سازی گردید. در مرحله بعد DNA مکمل (cDNA) توسط کیت سنتز cDNA مخصوص miRNA (BONmiR-Tehran) انجام شد. در کیت حاضر، واکنش پلی‌آدنیلاسیون و سپس رونویسی معکوس انجام می‌شود و RNA پلی‌آدنیله به cDNA مربوطه تبدیل می‌گردد و در نهایت، با استفاده از cDNAهای به‌وجودآمده واکنش Real-time PCR صورت می‌گیرد. واکنش qPCR برای cDNAهای سنتزشده بافتی و همچنین رده‌های سلولی، با استفاده از پرایمر اختصاصی miR-4516 انجام شد و نتایج به‌دست‌آمده با روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ آنالیز شدند. آنالیز به‌صورت نسبی یا relative انجام شده است که در آن بیان ژن در نمونه‌های سرطانی نسبت به نمونه‌های غیرسرطانی با استفاده از یک ژن خانه‌زاد (U6) بررسی شده است.

همسانه‌سازی توالی پیش‌ساز miR-4516

به‌منظور ایجاد ساختار پیش‌ساز miR-4516، ابتدا قطعه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

حاوی توالی پیش‌ساز miRNA توسط پرایمرهای F: TCGAGAGCTCGAGGTTGCCATGAGCCGAGA و R: TC TCGAGGTACCGGTGTCACCAGTAGCCTTCCT G تکثیر شد. در مرحله بعد وکتور pEGFP-N1 با استفاده از کیت Favor Gene استخراج گردید. وکتور و قطعه پیش‌ساز miR-4516 هرکدام به‌صورت جداگانه توسط دو آنزیم محدودکننده SacI و KpnI برش داده شده، سپس بر روی ژل قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از کیت استخراج از ژل، خالص‌سازی صورت گرفت تا برای انجام واکنش‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرند؛ بعد از انجام واکنش لیگاز، با استفاده از سلول‌های مستعد DH5α، ترانسفورماسیون صورت گرفت. برای اطمینان از صحت انجام کار و عدم ایجاد آلودگی در کنار پلیت اصلی، پلیت دیگری هم به‌عنوان کنترل منفی قرار گرفت که در آن باکتری فاقد وکتور به‌صورت چمنی کشت داده شد. بعد از گذشت حدود ۱۸ ساعت، بر روی کلونی‌های رشدکرده، کلونی PCR انجام شد. فرآیند کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای مستقیم CMV و معکوس GFPN صورت گرفت تا مشخص شود که کلونی‌ها حاوی پلاسمید نوترکیب هستند یا نه. بعد از آن برای تأیید نهایی همسانه‌سازی، تعیین توالی وکتور نوترکیب انجام شد.

انتقال وکتور حاوی توالی پیش‌ساز miR-4516 به لاین سلولی MCF-7

در این مطالعه برای بررسی اثر miR-4516، از رده سلولی MCF-7 استفاده شد. استفاده از این لاین به دلیل انجام درصد بالایی از ترانسفکت وکتور، نسبت به دیگر لاین‌ها می‌باشد. رده سلولی MCF-7، یک رده سلولی اپیتلیالی می‌باشد که در دوره زمانی حدود ۳۰ ساعت می‌تواند در محیط کشت سلولی دو برابر شود. این سلول‌ها دارای منشأ بافتی کارسینومای داکتال هستند و خاصیت متاستازی دارند. به منظور بررسی اثر miR-4516 بر روی رده سلولی، سلول‌های کشت داده‌شده، بعد از ۲۴ ساعت با وکتور کنترل (Cel-miR-67) و وکتور حاوی پیش‌ساز miR-4516 ترانسفکت شدند. انجام ترانسفکشن با روش لیپوفکتامین صورت گرفت. لازم به ذکر است که محیط مورد استفاده برای فرآیند فوق باید بدون سرم و آنتی‌بیوتیک باشد. محلول ترانسفکت ۵ ساعت روی سلول‌ها باقی ماند و بعد از این مدت برای سلول‌ها تعویض محیط انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سلول‌های ترانسفکت‌شده با میکروسکوپ فلوئورسنت مشاهده شدند تا راندمان ترانسفکت مشخص گردد. به منظور تأیید تولید miRNA بالغ از پیش‌ساز موجود در وکتور ترانسفکت‌شده، از روش qPCR به‌صورت مقایسه‌ای بین سلول‌های ترانسفکت‌شده با وکتور حاوی miR-4516 و وکتور کنترل استفاده شد.

بررسی اثر miRNA بر تکثیر و مهاجرت سلولی

در این روش پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ترانسفکشن، با وکتور miR-4516 انجام شد. بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت، بررسی میزان تکثیر با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) صورت گرفت. میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نمودار نسبت به کنترل رسم شد. برای بررسی تأثیر miRNA بر روی مهاجرت سلولی، از روش تست خراش استفاده شد. در این روش بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم نزدیک ۹۰ درصد، ترانسفکشن با وکتور حاوی miR-4516 انجام شد. سپس توسط سر سمپلر، سلول‌ها به‌صورت یک خط در مرکز پلیت حذف شدند و پس از شستشو با محلول PBS و حذف سلول‌های جداشده، عکس‌برداری در ساعت‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ انجام شد تا میزان مهاجرت سلولی بررسی شود.

آنالیز آماری

جهت بررسی آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS v.22 Inc., Chicago,IL) استفاده شد. برای تعیین معنی‌دار بودن میزان بیان ژن‌ها در نمونه‌های توموری و غیرتوموری و بررسی اندازه تومور و متاستاز از آزمون آماری t استفاده شد. درجه توموری و ارتباط آن با میزان بیان ژن با روش ANOVA سنجیده شد. سطح معنی‌داری برای محاسبات آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism V.7 استفاده شد.

نتایج

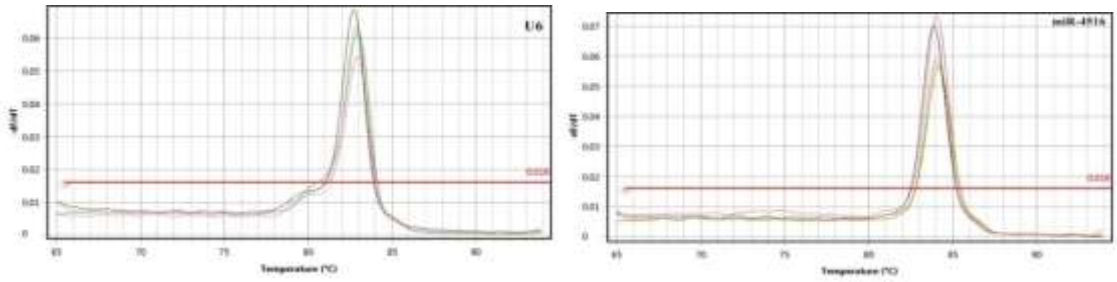
در این مطالعه، از ۳۵ بافت توموری سرطان پستان به همراه بافت سالم مجاور آن استفاده گردید. جدول ۱ اطلاعات کلینوپاتولوژی مربوط به نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. مطابق با بررسی دموگرافیک، نمونه‌های به‌دست‌آمده، دارای محدوده سنی ۲۵ الی ۷۰ سال با میانگین ۴۹ سال بودند. بیماری توسط پزشک متخصص تأیید و سرطانی‌بودن بافت‌ها توسط پاتولوژیست بررسی شده بود. در مطالعه با توجه به این‌که از بلوک‌های پارافینه سرطانی استفاده شد، نمونه‌ها به‌صورت برش‌های ۲۰ میکرونی به آزمایشگاه منتقل شدند. برای استخراج RNA سعی بر آن بود تا حتی‌الامکان بهترین شرایط به‌کار گرفته شود.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

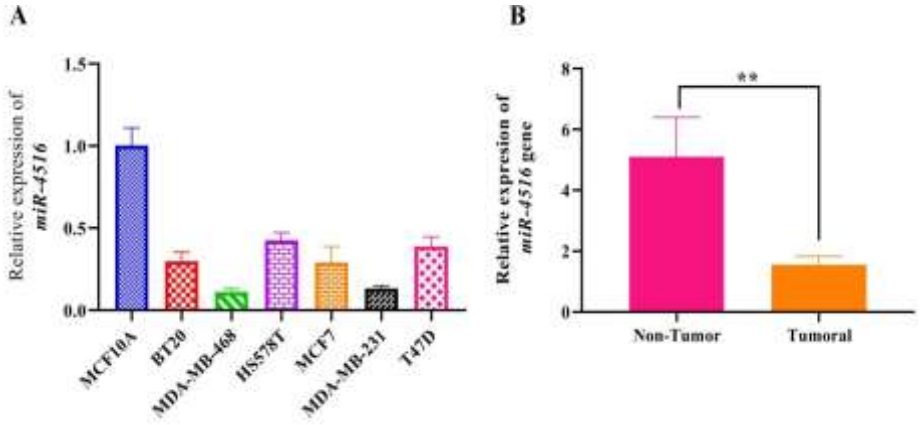
جدول شماره ۱- اطلاعات دموگرافیک و بالینی نمونه‌های موردمطالعه

ویژگی‌های بالینی		تعداد (درصد)
میانگین سنی در افراد سرطانی		۴۹/۹۵±۱۱/۴۲
میانگین اندازه تومور		۴/۱۱±۰/۹۰
متاستاز	مثبت	۱۹ (۴۷/۵)
	منفی	۲۱ (۵۲/۵)
درجه توموری	I	۱۳ (۳۲/۵)
	II	۱۹ (۴۷/۵)
	III	۸ (۲۰)

برای اطمینان از میزان سطح بیانی miR-4516، بیان آن در لاین‌های سرطانی پستان در مقایسه با رده سالم پستان به روش qPCR انجام شد. در این حالت، بیان در ۶ رده سلولی سرطان پستان و یک رده سالم بررسی شد و آنالیز، با روش ANOVA صورت گرفت. مطابق با این آنالیز کاهش بیان معنی‌دار (P=۰/۰۰۱) در رده‌های سرطانی مشاهده شد (شکل ۲ A). به منظور سنجش بیان miR-4516 در بافت‌های پارافینه توموری و سالم مجاور آن، بیان miRNA با روش qPCR سنجیده شد. منحنی ذوب ژن رفرنس داخلی *(U6)* و ژن اختصاصی *(miR-4516)* به‌صورت تک‌قله به‌دست آمد که خود بیانگر اختصاصی بودن تکثیر ژن‌ها می‌باشد. شکل ۱ منحنی ذوب مربوط به ژن U6 و miR-4516 را نشان می‌دهد. در مرحله بعد با توجه به ctهای به‌دست‌آمده، نمونه‌ها با روش‌های ΔΔCt، آماری t و ANOVA یک‌طرفه آنالیز شدند. مطابق با آنالیزهای انجام‌شده، میزان بیان miR-4516 در بافت‌های توموری، نسبت به بافت‌های سالم مجاور کاهش معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۰۱) (شکل ۲ B).



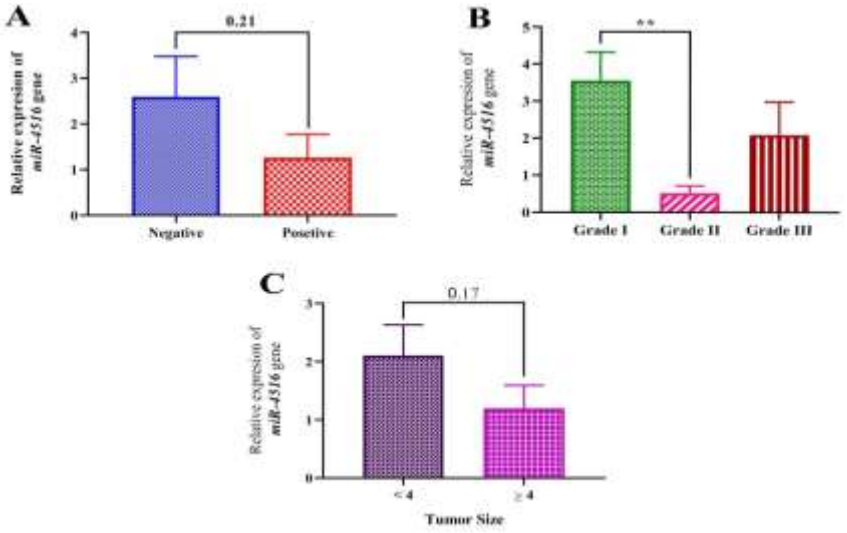
شکل شماره ۱- نمودارهای منحنی ذوب مربوط به ژن رفرنس (U6) و ژن اختصاصی (miR-4516)



شکل شماره ۲- بیان miR-4516 در لاین‌های سلولی مختلف سرطان پستان (A) و بافت توموری و غیرتوموری (B)

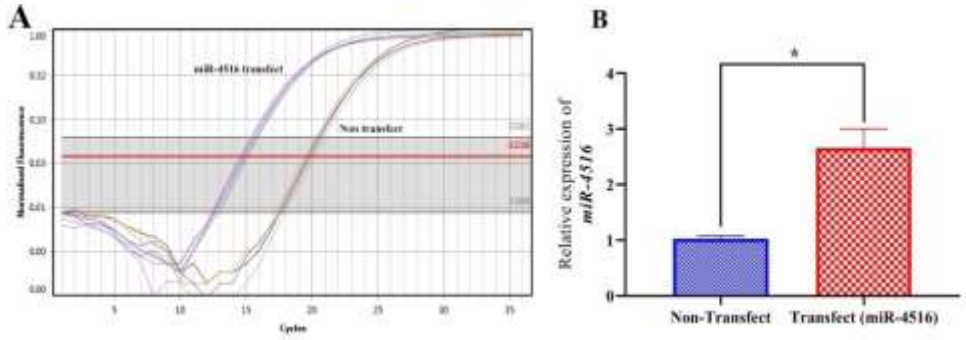
در بررسی فاکتور متاستازی و میزان بیان miRNA، نمونه‌ها از نظر متاستاز سرطان پستان به گره لنفی به دو دسته مثبت و منفی تقسیم شدند و بیان miRNA در این دو دسته با هم مقایسه شد. با توجه به بررسی، کاهش بیان در نمونه‌های متاستازی مشاهده شد؛ ولی این کاهش بیان از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۲۱) (شکل ۳-A). نمونه‌ها با توجه به درجه توموری در اطلاعات ثبت‌شده به سه دسته ۱ تا ۳ تقسیم‌بندی شدند. در بررسی بیان miR-4516 در این نمونه‌ها، کاهش بیان معنی‌داری در درجه ۲ توموری مشاهده شد (P=۰/۰۰۳) (شکل ۳-B). در بررسی اندازه تومور، میانگین اندازه به‌دست‌آمده برابر با ۴/۱۲ می‌باشد. بنابراین برای بررسی، نمونه‌ها به دو دسته دارای سایز کوچک‌تر از ۴ و بزرگ‌تر و مساوی ۴ تقسیم شدند. میزان بیان miR-4516 در اندازه توموری بزرگ‌تر از ۴ کاهش نشان داد، ولی این کاهش بیان از نظر آماری معنی‌دار نبود (P= ۰/۱۷) (شکل ۳-C).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]



شکل شماره ۳- میزان بیان miR-4516 در نمونه‌های متاستازی در مقایسه با نمونه‌های غیرمتاستازی (A)، در درجه‌های مختلف سرطان پستان (B) و در نمونه‌های دارای سایز توموری کوچک‌تر و بزرگ‌تر از ۴ سانتی‌متر (C).

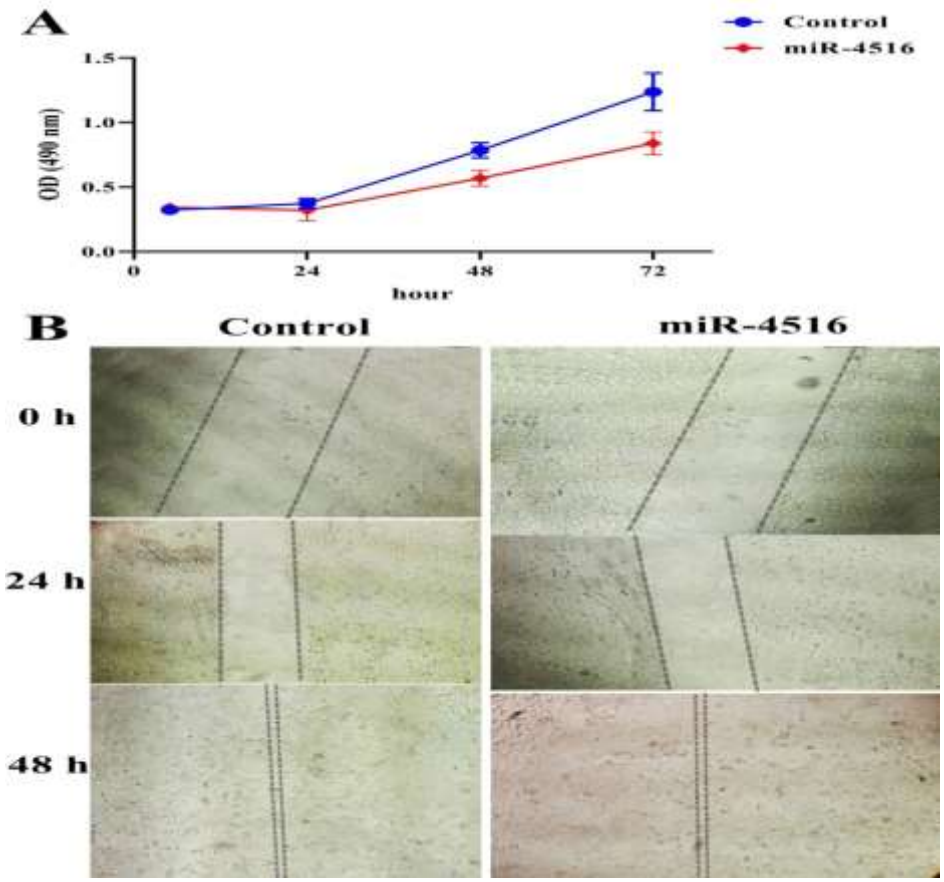
بعد از تکثیر توالی پیش‌ساز miR-4516، توالی در وکتور pEGFPN1 همسانه‌سازی شد و همسانه‌سازی توسط روش کلونی PCR و تعیین توالی تأیید شد. در مرحله بعد، به منظور بررسی اثر miR-4516 بر روی رده سلولی MCF-7، سلول‌های کشت داده‌شده بعد از ۲۴ ساعت با وکتور کنترل و وکتور حاوی پیش‌ساز miR-4516 ترانسفکت شدند. بعد از گذشت یک شبانه‌روز، سلول‌های ترانسفکت‌شده با میکروسکوپ فلوئورسنت مشاهده شدند. برای تأیید ترانسفکشن از روش qPCR استفاده شد. شکل A-۴ نمودار تکثیر در نمونه‌های ترانسفکت‌شده با وکتور حاوی miR-4516 و وکتور کنترل را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آنالیز انجام‌شده در این روش نشان داد که بیان miR-4516 در نمونه ترانسفکت‌شده، نسبت به کنترل به میزان ۲/۵ برابر افزایش داشته است (P=۰/۰۱) که این افزایش بیان نشان‌دهنده تولید miR-4516 به‌صورت بالغ می‌باشد.



شکل شماره ۴- نمودار تکثیر Real-time برای نمونه‌های ترانسفکت‌شده با وکتور کنترل و وکتور حاوی miR-4516 (A)، نمودار ستونی بیان نسبی miR-4516 در نمونه‌های ترانسفکت‌شده با وکتور کنترل و وکتور حاوی پیش‌ساز miRNA (B).

به منظور بررسی اثر miR-4516 بر روی میزان تکثیر سلولی، از روش MTT استفاده شد. شکل ۵ نمودار تکثیر سلول‌های تیمارشده بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد. مطابق با بررسی نمودار مشخص شد که miR-4516 می‌تواند سبب کاهش و یا توقف تکثیر در سلول‌های سرطان پستان MCF-7 شود (شکل ۵-A). بررسی تأثیر miRNA بر روی مهاجرت سلولی با تست خراش انجام شد. سلول‌ها در زمان صفر، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت عکس‌برداری شدند و توسط نرم‌افزار ImagJ سطح موردنظر بررسی شد. مطابق با آنالیز انجام‌شده تفاوت این سطح در پلیت کنترل در مقایسه با پلیت ترانسفکت‌شده با وکتور حاوی miR-4516 معنی‌دار نبود و این نتیجه حاصل می‌شود که miR-4516 بر روی مهاجرت سلولی اثری ندارد (شکل ۵-B).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]



شکل شماره ۵- نمودار تکثیر سلول‌های MCF-7 بعد از ترانسفکت با وکتور اختصاصی (A)، تست مهاجرت سلولی، در سلول‌های کنترل و ترانسفکت‌شده با وکتور حاوی miR-4516

بحث

به‌طور کلی مطالعات متعدد نشان داده‌اند که miRNAها نقش عمده‌ای در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای تکوینی از جمله متابولیسم، تکثیر سلولی، آپوپتوز، زمان‌بندی تکوین و سرنوشت سلول‌های عصبی بازی می‌کنند. افزایش بیان یا کاهش بیان miRNAها در سرطان‌های مختلف انسانی اتفاق می‌افتد. همچنین پیش‌بینی شده است که miRNAها پتانسیل بالایی دارند که در آینده نزدیک در تشخیص و درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرند. علی‌رغم اطلاعاتی که در رابطه با miR-4516 در زمینه اختلالات گوناگون ازجمله بعضی از سرطان‌ها وجود دارد، اما تا به امروز اطلاعات چندانی در زمینه ارتباط سرطان پستان با این miRNA دیده نشده است. miR-4516 در موقعیت 16p13.3 واقع شده است و به‌عنوان یک miRNA چندمنظوره دارای عملکرد می‌باشد و نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک مختلف دارد [۱۴]. این miRNA در اختلالات مختلف دچار افزایش و یا کاهش بیان می‌شود. بیان بیش از حد آن در سرطان پاپیلاری تیروئید [۱۵]، سرطان پروستات [۱۶] و اختلالات عصبی - شناختی مرتبط با HIV (HAND) گزارش شده است [۱۷]. Mandourah و همکاران با استفاده از آنالیزهای miRNA-PCR نشان دادند که بیان miR-4516 در سه گروه کنترل، افراد مبتلا به پوکی استخوان و افراد دارای تراکم پایین در استخوان، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارد. همچنین تجزیه و تحلیل بیشتر آن‌ها نشان داد که سطوح این miRNA با میزان شکننده بودن استخوان و نیز پایین بودن تراکم معدنی استخوان در بیماران مبتلا به پوکی استخوان دارای ارتباط است [۱۸]. در مطالعه‌ای دیگر توسط Erice Hlavin و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که تشخیص miRNA می‌تواند بازگشت بیوشیمیایی سرطان پروستات را بعد از پروستاتکتومی رادیکال (RP) که یک روش درمانی برای سرطان پروستات است، پیش‌بینی کند. در این مطالعه، دو miRNA جدید یعنی miR-4516 و miR-601 شناسایی شده‌اند که به‌طور قابل‌توجهی پیش‌بینی شکست بیوشیمیایی بعد از پرتودرمانی post salvage را در مقایسه با فاکتورهای بالینی هیستوپاتولوژیک مانند PSA بهبود بخشیده‌اند. این موضوع، استفاده از miRNA را در داخل مدل‌های پیش‌بینی‌شده بالینی حمایت کرد [۱۶]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر chowdhari و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثبات کردند که بیان miR-4516 به‌طور

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

قابل‌توجهی در پوست فرد مبتلا به پسوریازیس در مقایسه با فرد نرمال کاهش بیان پیدا می‌کند. آن‌ها اثبات کردند که این miRNA در تعدادی از پروسه‌های سلولی مانند حرکت کراتینوسایت‌ها، تکثیر و تمایز که در بیماری پسوریازیس به‌صورت نابه‌جا دچار تغییر می‌شود، به‌وسیله هدف قرار دادن مستقیم FN1 و ITGA9 به‌علاوه STAT3 دارای نقش می‌باشد [۱۴]. همچنین این محققان در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای دیگر بر روی بیماری پسوریازیس برای اوّلین‌بار اثبات کردند که بیان نابه‌جای miR-4516 به‌طور مستقیم، پروتئین STAT3 را با اتصال به 3'UTR آن در کراتینوسایت‌های کشت داده‌شده انسانی HaCaT هدف قرار می‌دهد. علاوه بر این نشان دادند که بیان بیش از حد has-miR-4516، بیان پروتئین‌های STAT3، P-STAT3، CDK6 و UBE2N را که در پسوریازیس افزایش بیان دارند، کاهش می‌دهد و آپوپتوز را در سلول‌های HaCaT القا می‌کند [۱۹]. Yajie Hu و همکارانش در رابطه با بیماری‌های عفونی نشان دادند که miR-4516 در عفونت آنتروویروس A71 کاهش بیان پیدا کرده [۲۰] و بالعکس در عفونت کوکساکی ویروس CV-A16 بیانش افزایش یافته است، با هدف قرار دادن PVRL1 عملکردهای سد نفوذپذیری اپیتلیالی را تنظیم می‌کند و ممکن است در تفاوت‌هایی که در بیماری‌زایی EV-A71 و CV-A16 دیده می‌شود، همکاری داشته باشد [۲۱]. به‌علاوه در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد که بیان miR-4516 در بیماران گلیوبلاستوما (GBM) با بقای کلی، رابطه عکس دارد؛ به‌گونه‌ای که افزایش بیان miR-4516 مانع رشد تومور می‌شود و آپوپتوز را القا می‌کند. رشد سلول توموری، به مهاجرت و تهاجم در هر دو نوع از سلول‌های GBM وابسته است که به‌طور موقتی بیان miR-4516 در آن‌ها افزایش پیدا کرده است و یا به‌صورت پایدار دچار افزایش بیان miRNA شده‌اند. این اثرات القاکننده توموری به‌وسیله هدف قرار دادن مستقیم دو ژن PTPN14 و CDK1A انجام می‌شود [۲۲].

نتیجه‌گیری

پرداختن به نقش miR-4516 در برخی از بدخیمی‌ها و انواع مختلف بیماری‌ها و نیز اشاره نکردن به نقشی که می‌تواند در سرطان پستان داشته باشد، از یک‌سو و توجه به این‌که سرطان پستان یک مشکل بهداشتی عمده در بین زنان از جمله زنان کشور ماست، از سوی دیگر ما را بر آن داشت تا میزان بیان آن را در بافت سرطانی پستان بررسی کنیم. براساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان بیان نسبی miR-4516 در حالت سالم و بیمار با هم تفاوت دارد، به این‌صورت که miR-4516 در حالت توموری در مقایسه با حالت سالم دچار کاهش بیان می‌شود. این کاهش بیان در حالت‌های مختلفی، مانند: متاستازی مثبت، درجه توموری بالا و سایز بزرگ تومور هم مشاهده شد. بعد از آن با تأثیر بر روی میزان تکثیر سلولی، می‌توان نتیجه گرفت که miR-4516 دارای نقش مهارکنندگی تومور می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد که حامی مالی و معنوی این پژوهش بودند، اعلام می‌دارند. همچنین بدین‌وسیله از کلیه افرادی که در این مطالعه، ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌کنیم. این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم رؤیا علی‌عسگری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک می‌باشد.

References:

[1] Matamala N, Vargas MT, González-Cámpora R, Miñambres R, Arias JI, Menéndez P, et al. Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection. ***Clin Chem*** 2015; 61: 1098-106.

[1] Hamam R, Hamam D, Alsaleh KA, Kassem M, Zaher W, Alfayez M, et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. ***Cell Death Dis*** 2017; 8: e3045.

[3] Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. ***Hum Mol Genet*** 2005; 14: R121-R32.

[4] Li Y,Kowdley KV. MicroRNAs in common human diseases. ***Genomics Proteomics Bioinformatics*** 2012; 10: 246-53.

[5] Qin H, Liu W. MicroRNA-99a-5p suppresses breast cancer progression and cell-cycle pathway through downregulating CDC25A. ***J Cell Physiol*** 2019; 234: 3526-37.

[6] Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. ***Nat Rev Cancer*** 2015; 15: 321.

[7] Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Res*** 2010; 1803(11): 1231-43.

[8] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. ***Nat*** 2003; 425: 415.

[9] Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. ***Sci*** 2004; 303: 95-8.

[10] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]

microRNAs: are the answers in sight? ***Nat Rev Genet*** 2008; 9: 102.
[11] Ardekani AM, Naeini MM. The role of microRNAs in human diseases. ***Avicenna J Med Biotechnol*** 2010; 2: 161.
[12] Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. ***Blood*** 2010; 116: e118-e27.
[13] Yoshikawa M, Fujii YR. Human ribosomal RNA-derived resident microRNAs as the transmitter of information upon the cytoplasmic cancer stress. ***Biomed Res Int*** 2016; 2016.
[14] Chowdhari S, Sardana K, Saini N. miR-4516, a microRNA downregulated in psoriasis inhibits keratinocyte motility by targeting fibronectin/integrin α9 signaling. ***Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*** 2017; 1863: 3142-52.
[15] Borrelli N, Denaro M, Ugolini C, Poma AM, Miccoli M, Vitti P, et al. miRNA expression profiling of 'noninvasive follicular thyroid neoplasms with papillary-like nuclear features' compared with adenomas and infiltrative follicular variants of papillary thyroid carcinomas. ***Mod Pathol*** 2017; 30: 39.
[16] Bell EH, Kirste S, Fleming JL, Stegmaier P, Drendel V, Mo X, et al. A novel miRNA-based predictive model for biochemical failure following post-prostatectomy salvage radiation therapy. ***PloS One*** 2015; 10: e0118745.
[17] Asahchop EL, Akinwumi SM, Branton WG, Fujiwara E, Gill MJ, Power C. Plasma microRNA profiling predicts HIV-associated neurocognitive disorder. ***Aids*** 2016; 30: 2021-31.
[18] Mandourah AY, Ranganath L, Barraclough R, Vinjamuri S, Hof RVT, Hamill S, et al. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis. ***Sci Rep*** 2018; 8: 8421.
[19] Chowdhari S, Saini N. hsa-miR-4516 mediated downregulation of STAT3/CDK6/UBE2N plays a role in PUVA induced apoptosis in keratinocytes. ***J Cell Physiol*** 2014; 229: 1630-8.
[20] Hu Y, Song J, Liu L, Zhang Y, Wang L, Li Q. microRNA-4516 Contributes to Different Functions of Epithelial Permeability Barrier by Targeting Poliovirus Receptor Related Protein 1 in Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Infections. ***Front Cell Infect Microbiol*** 2018; 8: 110.
[21] Samanta D, Almo SC. Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity. ***Cell Mol Life Sci*** 2015; 72: 645-58.
[22] Cui T, Gray A, Liu Z, Geurts M, Robe P, McElroy J, et al. A novel tumor-promoting role for miR-4516 in glioblastoma. ***AACR*** 2017.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-19]