Feyz Medical Sciences Journal
2024, Volume 28, Issue 1
Pages: 1-9
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.1.1
Original Article

Suppression of viability and migration in a human colorectal cancer cell line, HT-29, by 7SK long non-coding RNA

Shahin Aghamiri [1], Shohreh Farhadi [1], Hossein Ghanbarian [1,2], Kazem Sharifi [1,3]*

[1] Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Urogenital Stem Cell Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Anesthesiology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Corresponding author: Kazem Sharifi**, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: K.sharifi@sbmu.ac.ir

Received: 12 December 2023 **Revised:** 12 February 2024 **Accepted:** 12 February 2024

Abstract

Background and Aim: 7SK is a long non-coding RNA that interacts with various proteins to regulate gene transcription. This study aimed to assess the impact of exosomal delivery of 7SK on viability, expression of apoptosis-related genes, and migration in the human colorectal cancer cell line HT-29.

Methods: In this experimental study, HT-29 cells were treated with exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells loaded with 7SK (Exo-7SK). Control groups included cells treated with unloaded exosomes and untreated cells. The levels of 7SK in the cells, and expression of apoptosis-related genes were measured by real-time PCR, cell viability assessed by the MTT assay, and cell migration evaluated using the transwell assay.

Results: Treatment of HT-29 cells with Exo-7SK resulted in increased levels of 7SK, reduced viability, downregulation of the anti-apoptotic gene BCL-2, upregulation of the apoptosis-inducing gene BAX, and decreased migration.

Conclusion: Exosomal delivery of 7SK can effectively decrease the viability and migration of colorectal cancer cells. Further research is warranted to explore the therapeutic potential of this approach in colorectal cancer.

Keywords: 7SK long non-coding RNA, Colorectal cancer, Mesenchymal stem cells, Exosomes

Copyright© 2024. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۸، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳
صفحات: ۹-۱
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.1.1
اصیل پژوهشی

مهار زنده‌مانی و مهاجرت رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی HT-29 توسط RNA بلند غیرکدکننده 7SK

شاهین آغه میری[۱]، شهره فرهادی[۱]، حسین قنبریان [۱،۲]، کاظم شریفی[۱،۳*]

[۱] گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی مجاری ادراری تناسلی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳] مرکز تحقیقات بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۲۱ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۲/۱۱/۲۳ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: 7SK یک RNA بلند غیرکدکننده است که در تعامل با چندین پروتئین در تنظیم رونویسی ژن‌ها نقش دارد. در مطالعه حاضر، اثرات عرضه اگزوزومی 7SK بر زنده‌مانی، بیان ژن‌های آپوپتوز و مهاجرت در رده سلولی سرطان کولورکتال انسانی HT-29 ارزیابی شد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های HT-29 با اگزوزوم‌های جداسازی شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی بارگذاری شده با 7SK (Exo-7SK) تیمار شدند. از سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های فاقد بارگذاری و نیز سلول‌های بدون تیمار به عنوان کنترل استفاده گردید. سطح 7SK در سلول‌ها و بیان برخی از ژن‌های مؤثر در آپوپتوز با Real-time PCR، زنده‌مانی سلول‌ها با تست MTT، و میزان مهاجرت سلول‌ها با تست ترانس ول مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های HT-29 با Exo-7SK منجر به افزایش سطح 7SK، کاهش زنده مانی، کاهش بیان ژن ضد آپوپتوز BCL-2 و افزایش بیان ژن القا کننده آپوپتوز BAX، و نیز کاهش مهاجرت شد.

نتیجه‌گیری: عرضه اگزوزومی 7SK می‌تواند زنده‌مانی و مهاجرت سلول‌های سرطان کولورکتال را کاهش دهد. بررسی قابلیت درمانی این روش در سرطان کولورکتال نیازمند مطالعات بیشتر است.

کلیدواژه‌ها: RNA بلند غیرکدکننده 7SK، سرطان کولورکتال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اگزوزوم‌ها

*نویسنده مسئول: **کاظم شریفی.** پست الکترونیک: K.sharifi@sbmu.ac.ir
آدرس: گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مقدمه

سرطان کولورکتال پس از سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در ایران محسوب می‌شود [۱]. طبق آمار جهانی هم این سرطان در رتبه سوم از نظر شیوع (بعد از سرطان‌های پستان و ریه) و رتبه دوم مرگ و میر ناشی از سرطان (بعد از سرطان ریه) است و طی دو دهه آینده رشد فزاینده بار این بیماری به میزان حدود ۶۰ درصد پیش‌بینی می‌شود [۲]. این شواهد نشان می‌دهد علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه تحقیقاتی در جستجوی درمان سرطان، همچنان یافتن درمان‌های اثربخش برای سرطان کولون به‌عنوان یکی از معضلات جهانی حوزه سلامت جزء اولویت‌های تحقیقاتی است.

با توجه به تحقیقات گسترده در سال‌های اخیر در خصوص تاثیرات متنوع RNA های غیرکدکننده در تنظیم بیان ژن‌های مختلف و کارکردهای مهم سلول، بسیاری از این مولکول‌ها در ارتباط با بیماری‌های متنوع به ویژه سرطان به‌عنوان اهداف بالقوه مورد مطالعه و کانون توجه محققان قرار گرفته‌اند [۳]. 7SK یک RNA بلند غیرکدکننده (lncRNA) است که در برهم کنش با چند پروتئین نظیر MePCE، HEXIM1/2 و Larp7 در تنظیم رونویسی ژن‌ها نقش دارد [۴،۵]. این نقش تنظیم‌گری از طریق اتصال به فاکتور رونویسی P-TEFb و مهار فعالیت آن و در نتیجه مهار فعالیت RNA پلیمراز II و یا به واسطه مهار فعالیت HMGA1 اعمال می‌شود و بیان انبوهی از ژن‌های مؤثر در فعالیت‌های حیاتی سلول به ویژه چرخه سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۹-۶].

علیرغم شواهد بسیار در مورد نقش پروتئین‌های یاد شده، به ویژه HMGA1، به عنوان عوامل رشد انواع سرطان‌های مختلف که بعضاً آنها را به اهداف مهم درمان سرطان بدل کرده [۱۴-۱۰]، شواهد مستقیم کمی در خصوص نقش 7SK در سرطان گزارش شده است. در همین راستا، پیش از این، کاهش بیان 7SK در نمونه‌های بافتی و رده‌های سلولی مربوط به برخی سرطان‌ها نظیر سرطان پستان، سرطان کولون و لوسمی میلوئید مزمن توسط گروه تحقیقاتی ما در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی گزارش شده است [۱۵]. همچنین، همبستگی منفی میزان بیان 7SK و اندازه تومور در ارتباط با سرطان سلول‌های سنگفرشی زبان توسط گروه دیگری گزارش و نشان داده شده است که با مهار 7SK زنده مانی، مهاجرت و تومورزایی در سلول‌های سرطان مذکور افزایش می‌یابد [۱۶]. با توجه به این شواهد، بررسی این فرضیه که افزایش بیان 7SK می‌تواند اثرات ضد سرطانی داشته باشد، در دستور کار گروه تحقیقاتی حاضر قرار گرفت. علاوه بر این، برای افزایش بیان 7SK استفاده از حامل هایی که برای عرضه درون تنی 7SK در تحقیقات پیش بالینی و بالینی مناسب باشند در این تحقیقات مدنظر بود. بر این اساس در مطالعه اخیر گروه ما، با توجه به ویژگی‌هایی نظیر سهولت تولید، ایمنی زایی ناچیز و قابلیت هدفمندسازی، از اگزوزوم‌های جداسازی شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی به عنوان حامل استفاده شد و اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK برای تیمار سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی مورد استفاده قرار گرفت. در نتیجه عرضه اگزوزومی، میزان بیان 7SK در رده سلولی سرطان پستان سه‌گانه منفی به صورت چشمگیر افزایش یافت و منجر به کاهش فنوتیپ‌های سرطانی سلول‌های مذکور از جمله زنده‌مانی، مهاجرت و قابلیت تومورزایی در مدل حیوانی شد [۱۷]، با این وصف، قابلیت تعمیم اثرات ضد سرطانی عرضه اگزوزومی 7SK به سایر انواع سرطان‌ها هنوز مشخص نبوده، نیازمند بررسی بیشتر است.

گزارشات قبلی گروه ما از کاهش میزان بیان 7SK در نمونه‌های بافتی و رده سلولی سرطان کولورکتال حکایت دارد [۱۵]. همچنین HMGA1 به عنوان یکی از مهمترین شرکای 7SK در تنظیم رونویسی که فعالیت یا بیان آن توسط 7SK مهار می‌شود [۱۷،۱۸]، نقش شناخته شده‌ای در بروز و پیشرفت سرطان کولورکتال دارد. در همین راستا مطالعات متعددی نشان داده‌اند که میزان بیان HMGA1 در سرطان کولون افزایش می‌یابد [۱۹،۲۰]، میزان بیان HMGA1 با پیش آگهی و بقای بیماران رابطه معکوس دارد [۲۱] و افزایش بیان یا مهار HMGA1 در سرطان کولون به ترتیب موجب افزایش یا وقفه رشد سرطان کولون می‌شود [۲۰،۲۲]. بر این اساس و در ادامه مطالعات قبلی، در این مطالعه اثر عرضه اگزوزمی 7SK بر سرطان کولورکتال بررسی شد. به این منظور سلول‌های سرطان کولون رده HT-29 با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK تیمار شدند و از نظر میزان بیان 7SK، میزان زنده مانی، میزان بیان ژن‌های موثر در آپوپتوز و میزان مهاجرت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش‌ها

کشت و پاساژ رده سلولی سرطان کولورکتال

رده سلولی HT-29 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این رده سلولی در محیط کشت DMEM به همراه ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین و FBS ۱۰٪ سرم گوساله تازه متولد شده (Fetal Bovine Serum; FBS) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ CO_2 ٪ کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب (بالای ۷۰ درصد)، سلول‌ها با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵٪ از کف فلاسک جدا شدند. عمل پاساژ سلولی روی سلول‌ها انجام شد و سلول‌های پاساژ سوم برای مطالعات آتی مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی و مشخصه یابی اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK

آماده‌سازی و مشخصه یابی اگزوزوم‌های حاوی 7SK پیش از این در مطالعه قبلی گروه ما [۱۷] به صورت مشروح گزارش شده که از تکرار جزئیات روش کار (و نتایج) در اینجا صرفنظر می‌شود. به طور خلاصه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از وارتون ژلی بند ناف

انسانی (تهیه شده از بیمارستان آبان با رضایت والدین نوزاد) استخراج و در محیط DMEM/F12 حاوی ۱۵٪ FBS تکثیر شد. هویت این سلول‌ها از طریق بررسی موفولوژیک، ایمونوفنوتایپینگ (ردیابی فقدان مارکرهای سطحی CD45 و CD34 و وجود مارکرهای سطحی CD90 و CD105 به روش فلوسایتومتری) و تمایز به استخوان و چربی (در حضور محیط‌های تمایزی و رنگ آمیزی‌های اختصاصی) تایید شد. از پاساژ ۳-۶ سلول‌ها برای استخراج اگزوزوم از محیط کشت با کمک کیت ExoCIB (EXOCIB; Cibbiotech, Iran) استفاده شد. مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها از نظر اندازه و مورفولوژی به روش سنجش تفرق دینامیکی نور (DLS) و میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) و از نظر مارکرهای اختصاصی به کمک وسترن بلات انجام شد. غلظت پروتئین نمونه اگزوزوم خالص سازی شده با استفاده از کیت(bicinchoninic acid (BCA تعیین شد. 7SK به صورت برون‌تنی سنتز و به میزان ۳۰۰ pmol به روش الکتروپوریشن (v ۴۰۰، ۲ پالس، ۲۰۰ میکروثانیه) در اگزوزوم‌ها (۱۰۰ µg/ml) بارگذاری شد. ورود 7SK به اگزوزوم‌ها از طریق نشان‌دار کردن 7SK (حین سنتز) با Fluorescein-12-UTP و مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت تایید شد.

طراحی پرایمر

سایت NCBI برای به دست آوردن توالی کد کننده مربوط به mRNAها مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه با استفاده از سایت NCBI پرایمرهای مورد نظر طراحی و بلاست شدند (جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده به همراه توالی آنها

پرایمر	توالی (´3-´5)
7SK RNA	F: GCGATCTGGCTGCGACATCT R: AGCGCCTCATTTGGATGTGTCT
BAX	F: CGGGGAGCAGCCCAGAG R: CCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG
BCL-2	F: GCGACTCCTGATTCATTGG R: GTCTACTTCCTCTGTGATGTTG
TP53	F: AGCACTAAGCGAGCACTG R: CTGGGCATCCTTGAGTTCC
β-actin	F: GTCCTCTCCCAAGTCCACAC R: GGGAGACCAAAAGCCTTCAT

استخراج RNA و انجام Real-time PCR

RNA سلولی با استفاده از کیت استخراج RNA، (GeneAll, Hybrid-R™ Seoul, South Korea)، استخراج شد. در ادامه به منظور حذف آلودگی DNA، DNase I (RNase-free; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) مورد استفاده قرار گرفت و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. در نهایت بررسی کمی غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودرآپ انجام شد. سپس از Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase Kit (Fermentase, Hanover Germany) برای ساخت cDNA از ۱ میکروگرم RNA مورد استفاده قرار گرفت. Real-Time PCR با استفاده از دستگاه Step One (Applied Biosystems, USA) و مستر میکس سایبرگرین (Ampliqon, Copenhagen, Denmark) انجام شد. بیان نسبی 7SK و ژن‌های هدف با استفاده از ژن رفرنس β-actin نرمال شد. در گروه‌های مورد آزمایش، سطوح بیان 7SK و mRNAهای هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ کمی سازی شد.

ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از سنجش MTT

در ابتدا در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای، ۱×۱۰^{۴} سلول HT-29 کشت داده شد (محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ ٪ مورد استفاده قرار گرفت). ۲۴ ساعت بعد، محیط کشت سلول‌ها با محیط فاقد FBS تعویض شد و سلول‌ها به‌ترتیب با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اگزوزوم بارگذاری نشده تیمار شدند. پس از انکوبه کردن پلیت (در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی CO_2 ۵ ٪) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، آزمایش MTT انجام شد. برای این منظور، محیط کشت موجود در پلیت با استفاده از سمپلر خارج و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. در ادامه به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر) افزوده شد و پلیت به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در تاریکی انکوبه شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و ۱۵۰ میکرولیتر از حلال DMSO به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. از دستگاه (BioTek, USA) ELISA Reader برای بررسی شدت رنگ در طول موج ۵۷۰ نانومتر استفاده شد.

ارزیابی مهاجرت سلولی

ابتدا در محفظه بالایی چمبر، در محیط کشت DMEM بدون FBS، $۱۰^{۴}$ سلول HT-29 کشت داده شدند. ۴ ساعت بعد، سلول‌ها با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK یا اگزوزوم‌های بارگذاری نشده تیمار شدند یا به عنوان گروه کنترل اصلاً تیمار نشدند. مقدار برابر اگزوزوم در ۲ گروه بر اساس غلظت محتوای پروتئین اگزوزوم معادل ۱۰۰ µg/ml در حجم ۳۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد FBS در محفظه بالایی تنظیم شد. ۷۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FBS ۱۰ ٪ (که نقش جاذب شیمیایی را بازی می‌کند) به محفظه پایینی افزوده شد. ۴۸ ساعت بعد، ترانس ول به آرامی خارج شده و با استفاده از PBS مورد شستشو قرار گرفت. در ادامه با استفاده از سواب استریل سلول‌های سطح فوقانی غشای ترانس ول به خوبی جدا شدند. سلول‌هایی که مهاجرت کرده و به سطح تحتانی ترانس ول رسیده بودند با استفاده از اتانول ۷۰٪ و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه، تثبیت شدند. در ادامه سلول‌های تثبیت شده با استفاده از رنگ کریستال ویوله (۰/۱٪) رنگ آمیزی شدند. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون تعداد سلول‌ها با استفاده از

میکروسکوپ معکوس شمارش شدند. از نرم‌افزار ImageJ v1.8.0 برای کمی‌سازی داده‌های حاصل از تست مهاجرت استفاده شد.

محاسبات آماری

آنالیز آماری با استفاده از GraphPad Prism نسخه ۹/۵ انجام شد. پس از تایید توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از تست Shapiro–Wilk، تحلیل واریانس (Analysis of Variance) و آزمون تعقیبی Tukey به منظور مقایسه گروه‌های مختلف با یکدیگر مورد استفاده قرار گرفت. آزمایشات ۳ نوبت تکرار و میانگین ± SD برای گزارش نتایج داده‌ها استفاده شد. اختلاف میانگین با P <۰/۰۵ به‌عنوان معنادار بودن در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و اعضای محترم کمیته اخلاق مورد بررسی قرار گرفته و با کد اخلاق IR.SBMU.REC.1400.030 به تصویب رسیده است.

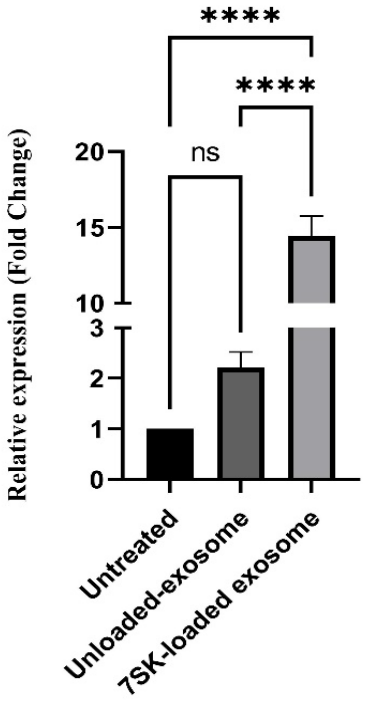
نتایج

افزایش سطح 7SK در سلول‌های HT-29 پس از تیمار با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK

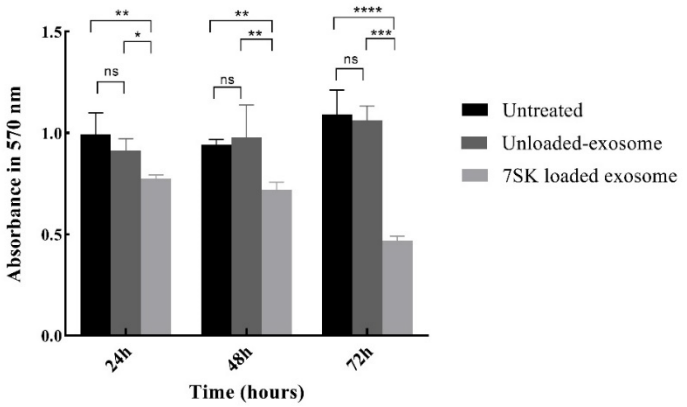
ورود 7SK به داخل سلول‌های HT-29 توسط اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK (Exo-7SK)، با استفاده از روش Real-time PCR ارزیابی شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار با Exo-7SK، سطح 7SK در سلول‌های HT-29 در مقایسه با گروه های کنترل افزایش معناداری نشان داد (شکل ۱).

کاهش زنده‌مانی سلول‌های HT-29 پس از انتقال اگزوزومی 7SK

آزمایش MTT به‌منظور مشخص نمودن اثرات Exo-7SK بر زنده‌مانی سلول‌های HT-29 مورد استفاده قرار گرفت. تیمار سلول های HT-29 با Exo-7SK منجر به کاهش معنادار زنده‌مانی این سلول‌ها در مقایسه با گروه‌های کنترل، در تمامی زمان‌های مورد آزمایش، شد (شکل ۲). همچنین تفاوت معناداری بین سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌های بارگذاری نشده و سلول‌های تیمار نشده، مشاهده نشد. با توجه به قدرت بالاتر Exo-7SK در زمان ۷۲ ساعت در کاهش زنده‌مانی سلول‌های HT-29 در مقایسه با سایر نقاط زمانی، این نقطه زمانی برای ادامه آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

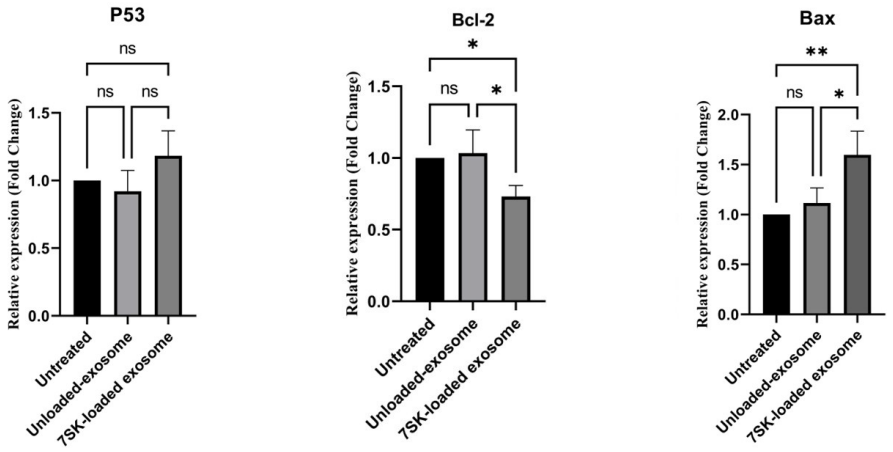


شکل ۱. افزایش سطح 7SK در سلول‌های HT-29 پس از تیمار با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK. نمودار میله‌ای بر اساس نتایج Real-time PCR سطح 7SK را در سلول‌های HT-29 پس از تیمار ۲۴ ساعته با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK و گروه‌های کنترل (تیمار با اگزوزوم های بارگذاری نشده و گروه تیمار نشده) نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین ± SD نشان داده شده است.**** P< ۰/۰۰۰۱



شکل ۲. کاهش زنده مانی سلول های HT-29 پس از تیمار با Exo-7SK. نمودار میله ای بر اساس نتایج تست MTT نشان می‌دهد که پس از تیمار سلول‌های HT-29 با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK، در نقاط زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در مقایسه با گروه‌های کنترل، زنده‌مانی این سلول‌ها کاهش یافته است. داده‌ها به صورت میانگین ± SD ارائه شده‌اند. (****P< ۰/۰۰۰۱، ***P< ۰/۰۰۱، **P< ۰/۰۱، * P<۰/۰۵) (ns= معنادار نیست).

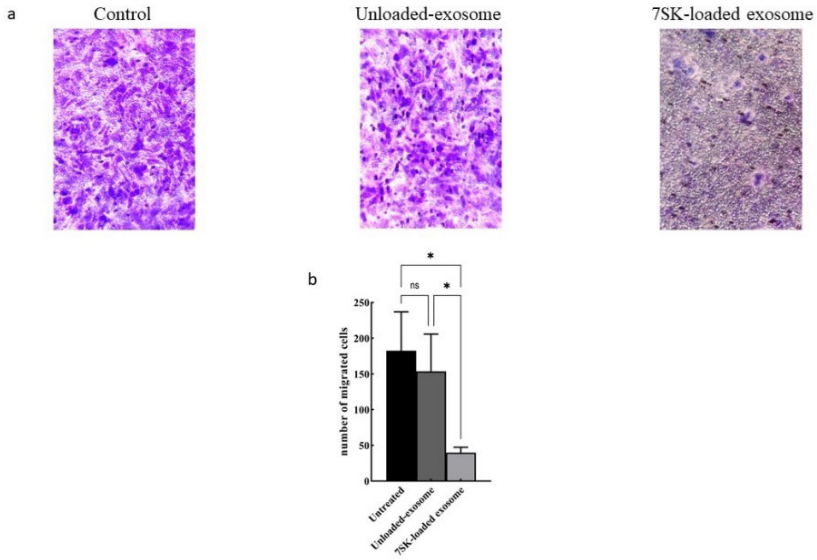
در ادامه اثر تحویل اگزوزومی 7SK به سلول های HT-29 بر میزان بیان ژن‌های BCL-2، BAX و TP53، که نقش اساسی در فرآیند آپوپتوز بازی می‌کنند، با استفاده از تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمار سلول‌های HT-29 با اگزوزوم های بارگذاری شده با 7SK در مقایسه با گروه‌های کنترل، منجر به کاهش معنادار بیان ژن ضد آپوپتوز BCL-2 و افزایش قابل توجه بیان ژن القا کننده آپوپتوز BAX شد (شکل ۳). اگرچه بیان ژن القا کننده آپوپتوز TP53 هم در سلول‌های تیمار شده با Exo-7SK در مقایسه با گروه‌های دیگر افزایش نسبی پیدا کرد، اما این افزایش از نظر آماری معنادار نبود (شکل ۳). گروه تیمار با اگزوزوم بارگذاری نشده و گروه تیمار نشده از نظر بیان هر ۳ ژن تفاوت معناداری نداشتند (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که Exo-7SK می‌تواند زنده‌مانی سلول‌های HT-29 را کاهش دهد.



شکل ۳. تغییر بیان ژن‌های مؤثر بر آپوپتوز در سلول‌های HT-29 در پی تیمار با Exo-7SK. نمودار میله‌ای بر اساس نتایج Real time PCR نشان میدهد پس از تیمار سلول‌های HT-29 با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK در مقایسه با گروه‌های کنترل، بیان ژن BAX افزایش و بیان ژن BCL-2 کاهش یافته و بیان ژن TP53 افزایش معناداری نداشته است. داده‌ها به صورت میانگین ± SD ارائه شده‌اند. (* P<۰/۰۵، **P< ۰/۰۱) (ns= معنادار نیست).

کاهش مهاجرت سلول‌های HT-29 پس از انتقال اگزوزومی 7SK

به منظور بررسی اثر 7SK بر قابلیت مهاجرت سلول‌های HT-29، سلول‌های تیمار شده با Exo-7SK و گروه‌های کنترل از نظر میزان مهاجرت در ترانس ول مقایسه شدند. میزان مهاجرت سلول‌های HT-29 پس از تیمار با Exo-7SK در مقایسه با گروه-های کنترل با کاهش معنادار همراه بود (شکل ۴). گروه تیمار با اگزوزم‌های بارگذاری نشده و گروه تیمار نشده از نظر میزان مهاجرت تفاوت معناداری نشان ندادند (شکل ۴).



شکل ۴. کاهش مهاجرت سلول‌های HT-29 در پی تیمار با Exo-7SK. (a) تصاویر معرف فتومیکروگراف تست مهاجرت با استفاده از ترانس ول که نشان می‌دهد. جمعیت سلول‌های HT-29 مهاجرت کرده در گروه تیمار با Exo-7SK نسبت به گروه‌های کنترل کاهش یافته است. (b) نمودار میله‌ای نتایج ارزیابی کمی تست مهاجرت سلولی را نمایش می دهد. داده‌ها به صورت میانگین ± SD ارائه شده اند. (** P<۰/۰۱). (ns= معنادار نیست).

بحث

سرطان کولون یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین انواع سرطان در ایران و جهان است که با توجه به شیوع فزاینده، از اولویت های تحقیقاتی برای یافتن درمان‌های جدید و اثربخش تلقی می‌شود [۱،۲]. انواع مختلف RNA های غیرکدکننده، با توجه به نقش تنظیم گری بر میزان بیان ژن‌های متنوع، از اهداف مهم تحقیقاتی در مقابله با سرطان به شمار می‌روند [۲۳]. RNA بلند غیرکدکننده 7SK در برهم کنش با چند پروتئین مختلف در قالب یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی نقش تنظیم‌گری در رونویسی جمعیت پرشماری از ژن‌ها، از جمله ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی دارد [۴،۲۴]. شواهد متعدد در مورد اثرات پروتئین های شریک 7SK بر پیشرفت سرطان به طور غیرمستقیم بر اثرات احتمالی 7SK بر سرطان دلالت دارد، اما شواهد مستقیم در این خصوص محدود است [۱۴–۱۰]. در همین راستا در پی شواهد اولیه‌ای نظیر کاهش بیان 7SK در برخی از انواع سرطان [۱۵] و پیشرفت سرطان سنگفرشی زبان در نتیجه مهار 7SK [۱۶]، اخیراً اثرات ضدسرطانی ناشی از عرضه اگزوزمی 7SK در رده سلولی سرطان پستان سه گانه منفی توسط گروه ما گزارش شده است [۱۷]، که قابلیت تعمیم این یافته به سایر انواع سرطان‌ها به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد. در مطالعه حاضر از طریق تیمار با اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK، میزان 7SK در رده سلولی سرطان کولون HT-29 افزایش یافت. بررسی-های اولیه سلولی و مولکولی نشان داد که افزایش بیان 7SK در رده سلولی سرطان کولون موجب کاهش میزان زنده‌مانی، تغییرات میزان بیان ژن‌های مؤثر در آپوپتوز و نیز کاهش میزان مهاجرت در سلول‌های مذکور می‌شود. این یافته‌ها و شواهد اولیه مجموعاً این فرضیه ما را تقویت می‌کند که 7SK می‌تواند واجد اثرات ضد سرطانی نسبت به سرطان کولون باشد.

طبق دانش ما، این مطالعه دومین گزارش منتشر شده مربوط به مهار فنوتیپ‌های سرطانی از طریق افزایش بیان 7SK است. یافته‌های این مطالعه هم راستا با گزارش قبلی گروه ما مبنی بر مهار فنوتیپ‌های سرطانی رده سلولی سرطان پستان سه گانه منفی در پی افزایش بیان 7SK است [۱۷]. این یافته‌ها، گزارش قبلی در خصوص پیشرفت فنوتیپ‌های سرطانی در سرطان سلول سنگفرشی زبان در پی مهار 7SK [۱۶] و نیز گزارش مربوط به کاهش بیان 7SK در نمونه های بافتی و رده های سلولی برخی از انواع سرطان [۱۵] را تایید می‌کند.

شواهد اولیه ارایه شده در این مطالعه در خصوص مهار رشد و مهاجرت سلول‌های سرطان کولون در نتیجه عرضه 7SK، هم‌راستا با گزارشات قبلی در خصوص اثرات HMGA1 بر پیشبرد سرطان مذکور است [۲۱–۱۹]. این هم راستایی مبتنی بر شواهد قبلی در مورد اثرات 7SK بر مهار فعالیت یا کاهش بیان HMGA1 می باشد [۱۷،۱۸].

نتایج این مطالعه نشان داد که اگزوزوم‌های بارگذاری شده با 7SK به صورت مؤثری قادر به افزایش میزان 7SK در سلول‌های سرطان کولون هستند. این یافته تاییدکننده یافته‌های مطالعه مشابه ما در سلول‌های سرطان پستان سه گانه منفی است [۱۷]. اگر چه کاربری اگزوزوم‌ها برای عرضه قطعات کوچک اسیدهای نوکلئیک به صورت مکرر گزارش شده [۲۵]، اما طبق دانش ما، گزارشات مربوط به عرضه RNA های بلند غیرکدکننده از طریق بارگذاری در اگزوزوم‌ها، محدود به همین دو مطالعه است. با توجه به قابلیت‌های درمانی فزاینده RNAهای بلند غیرکدکننده و نیز بی‌خطری نسبی و قابلیت هدفمندسازی اگزوزوم‌ها، یافته‌های این دو مطالعه بر اهمیت عرضه اگزوزومی برای مطالعات بالینی آینده بر پایه RNA های بلند غیرکدکننده تاکید دارد. همچنین هم راستا با مجموعه گزارشاتی که الکتروپوریشن را به‌عنوان روش مؤثر در غنی‌سازی اگزوزوم‌ها با اسیدهای نوکلئیک معرفی کرده‌اند [۲۶،۲۷]، در مطالعه فعلی و مطالعه قبلی ما از الکتروپوریشن برای غنی‌سازی اگزوزوم‌ها با 7SK استفاده و اثربخشی این روش مشخصاً برای بارگذاری RNA های بلند غیرکدکننده نشان داده شد.

در این مطالعه، اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاثیری بر رشد، زنده مانی و مهاجرت سلول‌های سرطان کولون نداشتند. این یافته مشابه مطالعه قبلی ما در مورد سرطان پستان سه گانه منفی [۱۷] و هم راستا با گروهی از مطالعات دیگر است [۲۸] و برخلاف مطالعاتی است که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی را موجب تقویت یا مهار فنوتیپ‌های سرطانی در سرطان کولون [۳۲–۲۹] و دیگر انواع سرطان [۳۷–۳۳] گزارش کرده‌اند. این نتایج متناقض می‌تواند ناظر به تفاوت در منبع تهیه سلول بنیادی مزانشیمی، ناشی از تفاوت در رده‌های سلولی و نمونه‌های سرطانی، یا به دلیل تفاوت در نحوه استخراج و نگهداری اگزوزوم باشد. بررسی دقیق‌تر در این مورد نیازمند مطالعات جامع با در نظر گرفتن تنوع یاد شده است.

در این مطالعه، به منظور بررسی سریع در خصوص امکان تعمیم اثرات مهاری گزارش شده 7SK در سرطان پستان به سرطان کولون، به شواهد محدود و اولیه برون‌تنی اکتفا شده و صرفاً با استفاده از یک رده سلولی، میزان زنده مانی، میزان مهاجرت و میزان بیان ژن‌های مهم دخیل در آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفته است. لذا بررسی‌های جامع‌تر در خصوص اثرات ضد سرطانی عرضه 7SK شامل انواع مختلف سرطان، انواع مدل‌های پیشرفته برون‌تنی و درون‌تنی سرطان، تنوع رده‌های سلولی و نمونه‌های سرطانی، تنوع فنوتیپ‌های سرطانی مورد بررسی و نیز استفاده از سایر انواع حامل‌ها در گروه تحقیقاتی ما به صورت هم زمان در حال انجام است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاضر با نشان دادن اثرات 7SK بر مهار رشد و مهاجرت یک رده سلولی سرطان کولون، عرضه اگزوزومی 7SK

را به‌عنوان یک گزینه درمانی بالقوه علیه این بیماری پیشنهاد می‌نماید. با این حال، تایید قابلیت درمانی 7SK در سرطان کولون نیازمند بررسی‌های بیشتر و جامع‌تر است.

تشکر و قدردانی: این مطالعه با پشتیبانی مالی دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (شماره گرنت ۳۱۳۸۸) انجام شده است.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Roshandel G, Ferlay J, Ghanbari-Motlagh A, Partovipour E, Salavati F, Aryan K, et al. Cancer in Iran 2008 to 2025: Recent incidence trends and short-term predictions of the future burden. Int J Cancer 2021;149(3): 594-605. doi:10.1002/ijc.33574 PMid:33884608
2. Colorectal cancer: World Health Organization. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer#:~:text=Colon%20cancer%20is%20the%20second,and%20mortality%20rates%20were%20observed.
3. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. Nature Reviews Genetics 2023. doi:10.1038/s41576-023-00662-1 PMid:37968332
4. Egloff S, Studniarek C, Kiss T. 7SK small nuclear RNA, a multifunctional transcriptional regulatory RNA with gene-specific features. Transcription 2018;9(2):95-101. doi:10.1080/21541264.2017.1344346 PMid:28820318 PMCid:PMC5834218
5. Camara MB, Sobeh AM, Eichhorn CD. Progress in 7SK ribonucleoprotein structural biology. Front Mol Biosci 2023;10:1154622. doi:10.3389/fmolb.2023.1154622 PMid:37051324 PMCid:PMC10083321
6. Quaresma AJ, Bugai A, Barboric M. Cracking the control of RNA polymerase II elongation by 7SK snRNP and P-TEFb. Nucleic Acids Res 2016;44(16): 7527-39. doi:10.1093/nar/gkw585 PMid:27369380 PMCid:PMC5027500
7. Zhou Q, Li T, Price DH. RNA polymerase II elongation control. Annu Rev Biochem 2012;81:119-43. doi:10.1146/annurev-biochem-052610-095910 PMid:22404626 PMCid:PMC4273853
8. Eilebrecht S, Bécavin C, Léger H, Benecke B-J, Benecke A. HMGA1-dependent and independent 7SK RNA gene regulatory activity. RNA Biol 2011;8(1):143-57. doi:10.4161/rna.8.1.14261 PMid:21282977
9. Eilebrecht S, Brysbaert G, Wegert T, Urlaub H, Benecke B-J, Benecke A. 7SK small nuclear RNA directly affects HMGA1 function in transcription regulation. Nucleic Acids Research 2010;39(6): 2057-72. doi:10.1093/nar/gkq1153 PMid:21087998 PMCid:PMC3064786
10. Zhao L, Liu Y, Tong D, Qin Y, Yang J, Xue M, et al. MeCP2 Promotes Gastric Cancer Progression Through Regulating FOXF1/Wnt5a/β-Catenin and MYOD1/Caspase-3 Signaling Pathways. EBioMedicine 2017;16:87-100. doi:10.1016/j.ebiom.2017.01.021 PMid:28131747 PMCid:PMC5474507
11. Wang Y, Hu L, Zheng Y, Guo L. HMGA1 in cancer: Cancer classification by location. J Cell Mol Med 2019;23 (4): 2293-302. doi:10.1111/jcmm.14082 PMid:30614613 PMCid:PMC6433663
12. Ji X, Lu H, Zhou Q, Luo K. LARP7 suppresses P-TEFb activity to inhibit breast cancer progression and metastasis. eLife 2014;3:e02907. doi:10.7554/eLife.02907 PMid:25053741 PMCid:PMC4126343
13. Tan Justin L, Fogley Rachel D, Flynn Ryan A, Ablain J, Yang S, Saint-André V, et al. Stress from Nucleotide Depletion Activates the Transcriptional Regulator HEXIM1 to Suppress Melanoma. Molecular Cell 2016; 62(1):34-46. doi:10.1016/j.molcel.2016.03.013 PMid:27058786 PMCid:PMC4836061
14. Najafi N, Gharib MH, Nematollahi N, Mehravar F. Preoperative evaluation of pelvic MRI findings in patients with rectosigmoid cancer in Golestan province (north of Iran). Novel Clin Med. 2022;1(3):127-34. doi: 10.22034/ncm.2022.337938.1041
15. Abasi M, Bazi Z, Mohammadi-Yeganeh S, Soleimani M, Haghpanah V, Zargami N, et al. 7SK small nuclear RNA transcription level down-regulates in human tumors and stem cells. Med Oncol 2016;33(11):128. doi:10.1007/s12032-016-0841-x PMid:27752877
16. Zhang B, Min S, Guo Q, Huang Y, Guo Y, Liang X, et al. 7SK Acts as an Anti-tumor Factor in Tongue Squamous Cell Carcinoma. Front Genet 2021;12: 642969. doi:10.3389/fgene.2021.642969 PMid:33868377 PMCid:PMC8047107
17. Farhadi S, Mohammadi-Yeganeh S, Kiani J, Hashemi SM, Koochaki A, Sharifi K, et al. Exosomal delivery of 7SK long non-coding RNA suppresses viability, proliferation, aggressiveness and tumorigenicity in triple negative breast cancer cells. Life Sci 2023;322:121646. doi:10.1016/j.lfs.2023.121646 PMid:37011870
18. Eilebrecht S, Brysbaert G, Wegert T, Urlaub H, Benecke B-J, Benecke A. 7SK small nuclear RNA directly affects HMGA1 function in transcription regulation. Nucleic Acids Res 2011;39(6): 2057-72 doi:10.1093/nar/gkq1153 PMid:21087998 PMCid:PMC3064786
19. Grade M, Hörmann P, Becker S, Hummon AB, Wangsa D, Varma S, et al. Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas. Cancer Res 2007;67(1): 41-56. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1514PMid:17210682 PMCid:PMC4721580
20. Xian L, Georgess D, Huso T, Cope L, Belton A, Chang Y-T, et al. HMGA1 amplifies Wnt signalling and expands the intestinal stem cell compartment and Paneth cell niche. Nature Communications 2017;8 (1):15008. doi:10.1038/ncomms15008 PMid:28452345 PMCid:PMC5414379
21. E MP, Liu T, Zhang X, Yang H, Wang J, Huang R, et al. High-mobility group A1 (HMGA1) gene expressions in various colorectal cancer cell lines and correlation with prognosis. Transl Cancer Res 2020; 9(2): 763-73. doi:10.21037/tcr.2019.12.10 PMid:35117422 PMCid:PMC8798761
22. Belton A, Gabrovsky A, Bae YK, Reeves R, Iacobuzio-Donahue C, Huso DL, et al. HMGA1 Induces Intestinal Polyposis in Transgenic Mice and Drives Tumor Progression and Stem Cell Properties in Colon Cancer Cells. PLOS ONE 2012; 7(1): e30034. doi:10.1371/journal.pone.0030034

PMid:22276142 PMCid:PMC3262796
23. Toden S, Zumwalt TJ, Goel A. Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer 2021;1875(1):188491. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188491 PMid:33316377 PMCid:PMC7856203
24. Camara MB, Sobeh AM, Eichhorn CD. Progress in 7SK ribonucleoprotein structural biology. 2023;10. doi:10.3389/fmolb.2023.1154622 PMid:37051324 PMCid:PMC10083321
25. Lu Y, Huang W, Li M, Zheng A. Exosome-Based Carrier for RNA Delivery: Progress and Challenges. Pharmaceutics 2023;15(2). doi:10.3390/pharmaceutics15020598 PMid:36839920 PMCid:PMC9964211
26. Yang Z, Shi J, Xie J, Wang Y, Sun J, Liu T, et al. Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation. Nature Biomedical Engineering 2020;4(1):69-83. doi:10.1038/s41551-019-0485-1 PMid:31844155 PMCid:PMC7080209
27. Zeng H, Guo S, Ren X, Wu Z, Liu S, Yao X. Current Strategies for Exosome Cargo Loading and Targeting Delivery. Cells. 2023; 12(10). doi:10.3390/cells12101416 PMid:37408250 PMCid:PMC10216928
28. Khazaei-Poul Y, Shojaei S, Koochaki A, Ghanbarian H, Mohammadi-Yeganeh S. Evaluating the influence of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-derived exosomes loaded with miR-3182 on metastatic performance of Triple Negative Breast Cancer cells. Life Sci 2021;286: 120015. doi:10.1016/j.lfs.2021.120015 PMid:34614416
29. Rezaei-Tazangi F, Alidadi H, Samimi A, Karimi S, Kahorsandi L. Effects of Wharton's jelly mesenchymal stem cells-derived secretome on colon carcinoma HT-29 cells. Tissue Cell 2020;67:101413. doi:10.1016/j.tice.2020.101413 PMid:32835945
30. Jahangiri B, Khalaj-Kondori M, Asadollahi E, Purrafee Dizaj L, Sadeghizadeh M. MSC-Derived exosomes suppress colorectal cancer cell proliferation and metastasis via miR-100/mTOR/miR-143 pathway. Int J Pharm 2022; 627: 122214. doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122214 PMid:36152993
31. Wu XB, Liu Y, Wang G-H, Xu X, Cai Y, Wang H-Y, et al. Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF-κB activation. Sci Rep 2016;6(1):21420. doi:10.1038/srep21420 PMid:26892992 PMCid:PMC4759824
32. Li H, Li F. Exosomes from BM-MSCs increase the population of CSCs via transfer of miR-142-3p. Br J Cancer 2018;119(6):744-55. doi:10.1038/s41416-018-0254-z PMid:30220706 PMCid:PMC6173771
33. Wu S, Ju GQ, Du T, Zhu YJ, Liu GH. Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. PLoS One 2013;8(4):e61366. doi:10.1371/journal.pone.0061366 PMid:23593475 PMCid:PMC3625149
34. Li D, Lin F, Li G, Zeng F. Exosomes derived from mesenchymal stem cells curbs the progression of clear cell renal cell carcinoma through T-cell immune response. Cytotechnology 2021; 73(4):593-604.doi:10.1007/s10616-021-00480-5 PMid:34349349 PMCid:PMC8319245
35. Zhao X, Wu X, Qian M, Song Y, Wu D, Zhang W. Knockdown of TGF-β1 expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells reverts their exosome-mediated EMT promoting effect on lung cancer cells. Cancer Lett 2018;428:34-44. doi:10.1016/j.canlet.2018.04.026 PMid:29702191
36. Zhou X, Li T, Chen Y, Zhang N, Wang P, Liang Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote the in vitro proliferation and migration of breast cancer cells through the activation of the ERK pathway. Int J Oncol 2019;54(5):1843-52. doi:10.3892/ijo.2019.4747 PMid:30864702
37. Du L, Tao X, Shen X. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit migration and invasion of breast cancer cells via miR-21-5p/ZNF367 pathway. Breast Cancer 2021; 28(4):829-37. doi:10.1007/s12282-021-01218-z PMid:33770377

How to Cite this Article:
Aghamiri S, Farhadi S, Ghanbarian H, Sharifi K. Suppression of viability and migration in a human colorectal cancer cell line, HT-29, by 7SK long non-coding RNA. Feyz Med Sci J. 2024;28(1):1-9. doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.1.1