

## جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل از طیور صنعتی و ارزیابی توانایی ویروس در القاء بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های توموری MCF-۷

آرش کلانتری<sup>۱</sup>، صمد فراشی بناب<sup>۲\*</sup>، هادی کیوانفر<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- پسادکتری ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۶

### چکیده

ویروس بیماری نیوکاسل از جمله ویروس‌های انکولیتیک است که در مطالعات مختلف تأثیر برخی سوبه‌های این ویروس در درمان تومورهای انسان بررسی شده است. با وجود این، مکانیسم دقیق مرگ سلول توموری توسط ویروس بیماری نیوکاسل مشخص نیست. این ویروس در گونه‌های مختلف پرندگان بیمارزا است و بیماری با واگیری زیاد ایجاد می‌کند. هدف مطالعه حاضر جداسازی ویروس بیماری نیوکاسل از طیور صنعتی و بررسی تأثیر آن بر القاء بیان ژن‌های مرتبط با مسیر داخلی و مسیر خارجی آپوپتوز در سلول‌های توموری پستان انسان بود. ویروس بیماری نیوکاسل از طیور صنعتی با کشت در تخم مرغ جنین‌دار جداسازی شد و با آزمون‌های هم‌گلو تیناسیون و RT-PCR تأیید شد. در شرایط برون‌تنی سلول‌های توموری MCF-۷ توسط ویروس جداسازی شده آلوده شدند. پس از استخراج RNA از سلول‌های توموری و ساختن cDNA، سطح بیان ژن‌های BAX، BAK و کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ با تکنیک Real-time RT-PCR در سلول‌های توموری آلوده به ویروس ارزیابی شد. آنالیز داده‌های Real-time RT-PCR نشان داد بیان ژن‌های BAX و کاسپاز ۹ در سلول‌های توموری آلوده به ویروس بیماری نیوکاسل به طور معنی‌داری بیشتر از بیان آنها در سلول‌های توموری کنترل است. بیان ژن‌های BAK، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ تغییر معنی‌داری در سلول‌های توموری آلوده به ویروس در مقایسه با سلول‌های توموری کنترل نداشت. این یافته‌ها نشان می‌دهند ویروس بیماری نیوکاسل جداسازی شده از طیور صنعتی می‌تواند شروع مسیر داخلی آپوپتوز را در سلول‌های توموری MCF-۷ القاء کند.

**کلمات کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، تومور، آپوپتوز، مسیر خارجی آپوپتوز، مسیر داخلی آپوپتوز، بیان ژن**

\*نویسنده مسئول: صمد فراشی بناب

آدرس: گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. تلفن ۰۲۱۸۸۹۵۳۰۰۹

پست الکترونیک: Farashibs@yahoo.com

## مقدمه

ویروس‌های بیماریزا با آلوده کردن سلول‌های میزبان و تکثیر در داخل آنها می‌توانند منجر به تخریب سلول‌های بافت شوند. برخی از ویروس‌ها توانایی آلوده کردن و تخریب سلول‌های توموری یا سرطانی را دارند که ویروس‌های انکولیتیک (Oncolytic viruses) نامیده می‌شوند. از دهه ۱۹۵۰ مطالعات بالینی بر روی ویروس‌های انکولیتیک انجام شده است (۳۹).

ویروس‌های انکولیتیک متعددی تا به حال شناسایی شده است از جمله آدنوویروس (۴۶)، رئوویروس (۱۲)، (۳۰)، ویروس واکسینیا (۳۷، ۵۰)، ویروس تورم دهان تاولی (۳۳)، ویروس میکسوما (۳۷)، هرپس ویروس (۴۷) و ویروس بیماری نیوکاسل (۴۵).

در مطالعات مختلف اثرات ضد توموری ویروس بیماری نیوکاسل (Newcastle disease virus) بر روی سلول‌های توموری انسان نشان داده شده است (۶). بیماری نیوکاسل بیماری ویروسی با واگیری زیاد در پرندگان می‌باشد. ویروس بیماری نیوکاسل یا ارتسوا وولا ویروس-۱ پرندگان (Avian orthoavulavirus-1) در جنس ارتسوا وولا ویروس (Orthoavulavirus)، تحت خانواده آوولا ویرینه (Avulavirinae) و خانواده پارامیکسو ویرینه (Paramyxoviridae) از رده مونوننگا ویرالز (Mononegavirales) قرار دارد (۲۱). ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) پوشینه‌دار بوده و دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای تک‌ملکولی سنس منفی با اندازه حدود ۱۵ کیلوباز است که حاوی اطلاعات ژنتیکی برای RNA پلیمراز، پروتئین‌های هماگلوتینین-نورآمینیداز (Haemagglutinin-neuraminidase)، پروتئین امتزاجی (Fusion)، پروتئین زمینه‌ای (Matrix)، فسفو پروتئین (Phosphoprotein) و پروتئین

نوکلئوکپسید (Nucleocapsid) می‌باشد (۱۷). این ویروس گونه‌های مختلف پرندگان را آلوده می‌کند و در بسیاری از کشورها اندمیک است و تأثیر آن در طیور اهلی قابل توجه می‌باشد (۲). عفونت پرندگان با NDV می‌تواند همراه با طیف وسیعی از علائم بالینی باشد و بسته به حدت ویروس تلفات متغیر است به طوری که گاهی بدون تلفات است و گاهی مرگ و میر تا ۱۰۰٪ می‌رسد (۳۱، ۴۱). بر اساس شدت بیماری در پرندگان، NDV به چهار پاتوتیپ شامل پاتوتیپ روده-ای بدون علامت (فاقد حدت)، لتوژنیک (حدت پایین)، مزوژنیک (حدت متوسط) و ولوژنیک (حدت بالا) طبقه‌بندی می‌شود (۲). سویه‌های مزوژنیک و ولوژنیک عامل بسیاری از اپیدمی‌های بیماری نیوکاسل در کشورهای مختلف هستند (۱).

مکانیسم‌های متعددی در کشتن سلول توموری توسط ویروس‌های مختلف نقش دارند از جمله تخریب مستقیم سلول، اختلال در مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی و تحریک پاسخ‌های ایمنی (۱۶، ۲۰، ۳۴، ۴۰). همچنین در مطالعات متعدد نشان داده شده است که برخی از ویروس‌ها از جمله NDV در سلول‌های آلوده به ویروس آپوپتوز القاء می‌کنند (۵، ۷، ۱۶، ۱۹، ۲۵، ۳۲، ۳۵).

آپوپتوز (Apoptosis) یک واژه یونانی به معنی ریزش برگ درختان پاییزی است. این واژه اولین بار توسط Kerr و همکاران در سال ۱۹۷۲ جهت توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیک و تمایز آن از نکروز سلولی به کار برده شد (۲۳). آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها (Programmed cell death) می‌باشد که در زمان تکامل جنین برای حذف سلول‌هایی که دیگر نیاز به آنها نیست و همچنین پس از تولد برای حذف سلول‌هایی که عملکرد

موتیف حفاظت شده به نام‌های BH<sup>۱</sup>، BH<sup>۲</sup>، BH<sup>۳</sup> و BH<sup>۴</sup> شناسایی شده است. پروتئین‌های Bcl-۲ بر اساس ساختار و فعالیت به سه دسته تقسیم می‌شوند: الف) اعضای ضد آپوپتوزی (Anti-apoptotic) که شامل Bcl-۲، Bcl-XL و ... هستند و حداقل دو موتیف حفاظت شده دارند. ب) اعضای پرو آپوپتوزی (Pro-apoptotic) شامل Bak، Bax و ... که دارای چهار موتیف حفاظت شده هستند. ج) اعضای دارای موتیف حفاظت شده BH<sup>۳</sup> که برای القاء خاصیت کشندگی لازم است و شامل Bad، Bik، Bim و ... می‌باشد (۱۴، ۲۲).

با توجه به اینکه مکانیسم دقیق مرگ سلول‌های توموری انسان توسط سویه‌های مختلف NDV مشخص نیست و القاء آپوپتوز در سلول‌های آلوده به ویروس یکی از مکانیسم‌های دخیل در مرگ سلول توموری توسط برخی سویه‌های NDV گزارش شده است (۱۶)، در این مطالعه NDV از طیور صنعتی مبتلا به بیماری نیوکاسل جداسازی شد و توانایی آن در القاء بیان ژن‌های مرتبط با مسیر داخلی و مسیر خارجی آپوپتوز در سلول‌های توموری پستان انسان (MCF-۷) ارزیابی شد.

### مواد و روش کار

#### نمونه برداری و جداسازی ویروس

با مراجعه به مرغداری‌های صنعتی شهرستان کرج که به بیماری نیوکاسل مبتلا شده بودند اقدام به جمع آوری لاشه‌های تازه تلف شده شد. پس از کالبد گشایی لاشه‌ها، از دستگاه تنفس ۱۰ پرنده با علایم مشکوک به بیماری نیوکاسل نمونه برداری شد. برای نمونه برداری، لواژ برونشیل با تزریق سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ استریل به داخل نای و ریه انجام شد. پس از پالایش نمونه‌های مایع لواژ به دست آمده با فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری، نمونه‌ها به داخل حفره آلانتویک

غیرطبیعی دارند اتفاق می‌افتد. چروکیدگی سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA، از دست دادن چسبندگی سلول و تخریب اسکلت سلولی، بالونی شدن سطح سلول و در نهایت تولید اجسام آپوپتوزی (Apoptotic bodies) در حین آپوپتوز در سلول رخ می‌دهد. اجسام آپوپتوزی قسمتی از سیتوپلاسم و هسته سلول هستند که در وزیکول‌های پلاسمایی قرار گرفته‌اند و همچنین حاوی ریبوزوم هستند. این وزیکول‌ها به سرعت توسط سلول‌های بیگانه‌خوار (فاگوسیت‌کننده‌ها) یا سلول‌های اپیتلیال مجاور شناسایی و حذف می‌شوند بدون این که پاسخ التهابی در محل ایجاد شود (۲۶، ۳۰). در این روند سلول بدون اینکه التهاب ایجاد شود محو می‌شود.

آپوپتوز در سلول‌ها از طریق سه مسیر آغاز می‌شود. این مسیرها به نام‌های مسیر خارجی (Extrinsic pathway)، مسیر داخلی (Intrinsic pathway) و مسیر گرانزیم B (Granzyme B pathway) نام گذاری شده‌اند. مسیر خارجی آپوپتوز با اتصال لیگاند به گیرنده‌های مرگ در سطح سلول که منجر به فعال شدن کاسپاز ۸ می‌شود به راه می‌افتد. مسیر داخلی آپوپتوز به وسیله استرس‌های سلولی که منجر به فعال شدن کاسپاز ۹ می‌شود شروع می‌شود. در مسیر گرانزیم B، گرانزیم B که یک پروتئاز کشنده سلولی است به داخل سلول هدف وارد می‌شود. هر سه مسیر شروع کننده آپوپتوز در نهایت منجر به فعال شدن پروتئولیتیک کاسپاز ۳ یا کاسپاز ۷ می‌شوند که کاسپازهای اجرایی (Executioner) می‌باشند (۳۸، ۴۳).

پروتئین‌های خانواده Bcl-۲ (B cell lymphoma-2) در تنظیم آپوپتوز نقش دارند. Bcl-۲ ابتدا به عنوان پروتوانکوژن در لنفومای فولیکولار سلول‌های B شناسایی شد. در پروتئین‌های این خانواده چهار

میلی لیتر محیط کشت سلول کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌های کشت داده شده به وسیلهٔ PBS (Phosphate buffered saline) سیگما آلدریج، بریتانیا) شستشو داده شدند و با ۸ واحد هم‌گلو تیناسیون از NDV جداسازی شده از طیور صنعتی آلوده شدند. به سلول‌های توموری گروه کنترل به جای ویروس، PBS به محیط کشت اضافه شد. سلول‌ها مجدداً در دمای ۳۷°C و اتمسفر حاوی ۹۵٪-۹۰ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن به مدت ۵ روز انکوبه شدند و در زمان‌های مختلف از نظر مورفولوژی با میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شدند.

### استخراج RNA و سنتز cDNA از سلول‌های توموری

برای بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های توموری آلوده به ویروس و سلول‌های توموری کنترل، RNAها از سلول‌های توموری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون استخراج شدند. برای استخراج RNAها، سلول‌های با استفاده از ۱ ml بافر لیز کننده حاوی گوانیدین تیوسیانات (کیازول، آمریکا) متلاشی شدند. سپس با اضافه کردن کلروفرم (۰/۲ ml) و سانتریفیوژ میکروتیوب‌ها (در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C) RNAها جداسازی شدند و با ایزوپروپانل (۰/۵ ml) و سانتریفیوژ (با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C) رسوب داده شدند. رسوب‌های به دست آمده با اتانل ۷۵٪ (۱ ml) شستشو داده شدند و پس از سانتریفیوژ (در دور ۷۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C) در آب عاری از RNase حل شدند. برای تعیین کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده، میزان جذب نوری RNAها در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترموفیشر ساینتیفیک، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

تخم مرغ‌های جنین دار ۷-۹ روزه تزریق شدند. تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷°C و رطوبت ۵۵٪ به مدت ۴ روز و پس از آن، در دمای ۴°C به مدت یک شب انکوبه شدند. سپس مایع آلانتوئیک به صورت استریل از تخم مرغ‌ها جمع‌آوری شد و مایعات جمع‌آوری شده در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. حضور NDV در مایع آلانتوئیک از طریق آزمون هم‌گلو تیناسیون (Haemagglutination) با استفاده از پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی V شکل بررسی شد. عیار ویروس‌های واجد هم‌گلو تینین در هر نمونه به صورت واحد هم‌گلو تیناسیون در هر میلی‌متر (HAU/ml) ثبت شد.

برای تأیید حضور NDV در نمونه‌ها، از تکنیک Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) مطابق پروتوکول منتشر شده Gohm و همکاران در سال ۲۰۰۰ استفاده شد (۱۸).

### آلوده کردن سلول‌های توموری به ویروس

سلول‌های MCF-7 که رده‌ی سلولی آدنوکارسینوما ی پستانی انسان هستند، در محیط کشت (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium؛ گیکو، بریتانیا) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum؛ سیگما آلدریج، بریتانیا) حرارت دیده در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه (جهت غیرفعال کردن کمپلمان) و ۱۰۰ U/ml پنی سیلین (اینیتروزن، بریتانیا) و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (اینیتروزن، بریتانیا) کشت داده شدند و در دمای ۳۷°C و اتمسفر حاوی ۹۵٪-۹۰ رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. پس از آن که تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰٪ رسید، سلول‌ها با استفاده از تریپسین (سیگما آلدریج، بریتانیا) از فلاسک‌های کشت سلول جمع‌آوری شدند و مجدداً در ظروف کشت سلول به تعداد  $10^5 \times 7$  سلول در هر

برای حذف هر گونه DNA باقیمانده در RNA های استخراج شده، ۱ واحد آنزیم DNase عاری از RNase (ترموفیشر، آمریکا) و ۱ μl بافر آنزیم به ۱ μg RNA اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوباسیون انجام شد. برای توقف واکنش ۱ μl EDTA با غلظت ۵۰ mM (میلی مولار) به RNA ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C انکوباسیون انجام شد. سپس سنتز cDNA از روی RNA های استخراج شده توسط آنزیم رونوشت برداری معکوس M-MuLV (ترموفیشر، آمریکا) در حضور بافر آنزیم، پرایمرهای رندوم هگزامر، dNTP و RNA guard طبق پروتوکول کارخانه سازنده و با انکوباسیون در دماهای ۲۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه و ۷۵°C به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسیکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد.

### Real-time RT-PCR

برای انجام Real-time RT-PCR از مسترمیکس PCR شامل DNA پلیمرز Taq (Hot start)، بافر PCR حاوی KCl و  $(NH_4)_2SO_4$ ، dNTP،  $MgCl_2$ ، رنگ فلورسنت SYBR-green I و رنگ فرانس غیرفعال ROX (اپلاید بیوسیستم، آمریکا) استفاده گردید و به آن پرایمرهای اختصاصی ۱۸sRNA (ژن Housekeeping)، BAK، BAX و کاسپاز ۳، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ با غلظت ۰/۲۵ μM و cDNA (حدود

۵۰۰ ng) اضافه شد (با حجم نهایی محلول واکنش ۱۵ μl). چرخه های حرارتی شامل ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه (برای فعال سازی آنزیم) و به دنبال آن ۴۵ چرخه دو مرحله های ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه (مرحله واسرشتگی [Denaturation]) و ۵۸°C به مدت ۶۰ ثانیه (مرحله اتصال-مرحله امتداد [Annealing-Extension]) بود که در دستگاه Applied Biosystems مدل StepOnePlus انجام شد. پس از اتمام چرخه های حرارتی PCR، برای تأیید تکثیر قطعه ژنی مورد نظر در حین چرخه های PCR، بر روی محصول PCR آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) انجام شد. برای رسم منحنی ذوب ابتدا دمای میکروتیوب ها به ۹۵°C رسانده شد و سپس دما به ۶۰°C کاهش یافت و به تدریج دما از ۶۰°C به ۹۵°C افزایش یافت و در طی این مدت (هر ۰/۳°C افزایش دما) فلورسنس ساطع شده از میکروتیوب ها جهت رسم منحنی ذوب جمع آوری شد.

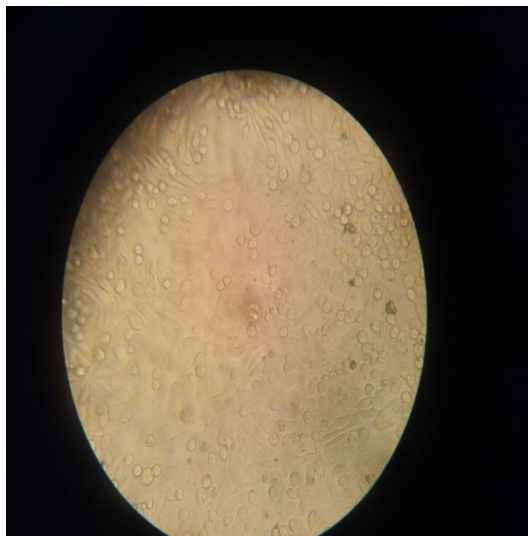
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژنی با تکنیک Real-time RT-PCR

نام ژن	Forward	Reverse
Caspase-3	5'-TGGTTCATCCAGTCGCTTTG-3'	5'-CATCTGTTGCCACCTTTCG-3'
Caspase-8	5'-AGGAGCTGCTCTCCGAATT-3'	5'-CCCTGCCTGGTGTCTGAAGT-3'
Caspase-9	5'-ACTAACAGGCAAGCAGCAAAGT-3'	5'-ACATCACCAAATCCTCCAGAAC-3'
BAK	5'-GGTCCTGCTCAACTCTACCC-3'	5'-CCTGAGAGTCCAACCTGCAAA-3'
BAX	5'-GGGGACGAACTGGACAGTAA-3'	5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'
18S rRNA	5'-AGGAATTCACAGTAAGTGCG-3'	5'-GCCTCACTAAACCATCCAA-3'

نتایج

میکروسکوپی نشان داد این ویروس تأثیری بر مورفولوژی سلول‌ها که قابل تشخیص با میکروسکوپ نوری باشد ندارد و اثرات آسیب سلولی ( Cytopathic effects) در سلول‌ها مشاهده نشد (شکل ۱).

مورفولوژی سلول‌های MCF-۷ آلوده شده به NDV جداسازی شده از طیور صنعتی و سلول‌های MCF-۷ کنترل (کشت شده در غیاب NDV) هر روز به مدت ۵ روز با میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شد. آزمون



ب

الف

شکل ۱. سلول‌های MCF-۷ کشت داده شده به مدت ۵ روز. الف) سلول‌های MCF-۷ کنترل ب) سلول‌های MCF-۷ آلوده به NDV جداسازی شده از طیور صنعتی

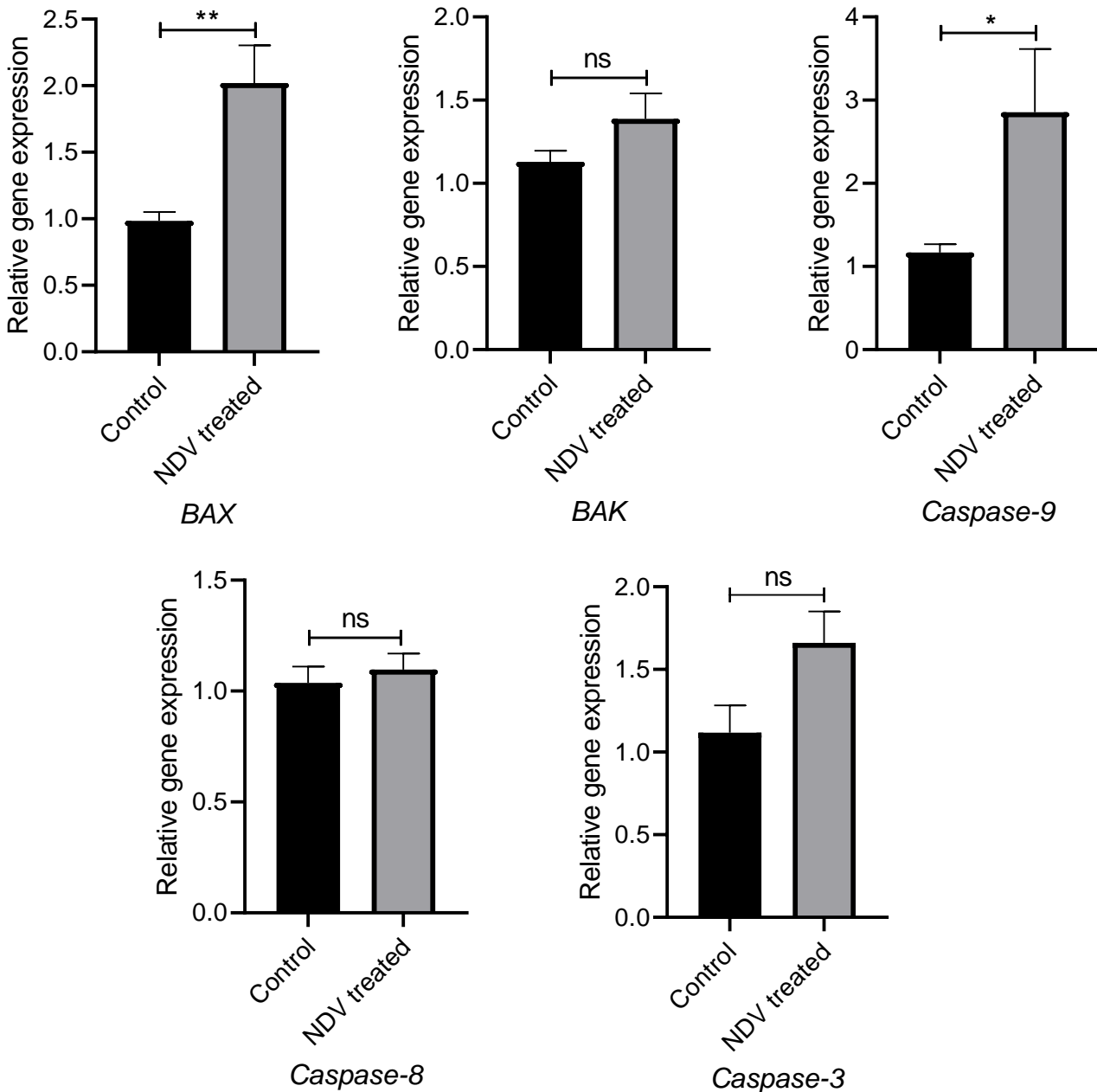
رشته DNA است نشان داد دمای ذوب نمونه‌ها بالای ۸۰°C است و تنها یک پیک برای هر محصول PCR به دست آمد که حاکی از تکثیر موفق و اختصاصی قطعه ژنی مورد نظر بود. آنالیز داده‌های به دست آمده از Real-time RT-PCR با متود دلتا-دلتا سی تی نشان داد بیان ژن BAK در سلول‌های توموری MCF-۷ آلوده شده با NDV جداسازی شده از طیور صنعتی در مقایسه با میزان بیان آن در سلول‌های توموری گروه کنترل به میزان ۱/۲۸ برابر افزایش یافته است. این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). بیان ژن BAX در سلول‌های توموری MCF-۷ آلوده شده با NDV ۲/۰۵ برابر افزایش نشان داد ( $p \leq 0/05$ ). بیان ژن کاسپاز ۸ در سلول‌های توموری آلوده شده با NDV و سلول‌های توموری کنترل تقریباً یکسان بود. بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌های توموری آلوده شده با NDV

در بررسی کیفیت و کمیت RNAهای استخراج شده از سلول‌های توموری کنترل و سلول‌های توموری آلوده به NDV با نانودراپ، نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ RNAها به دست آمد. میانگین جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ RNAها  $1/82 \pm 0/85$  و میانگین جذب نوری ۲۶۰/۲۳۰ RNAها  $1/32 \pm 0/6$  بود. این داده‌ها حاکی از کیفیت مناسب RNAهای استخراج شده جهت سنتز cDNA بود.

برای بررسی سطح بیان ژن‌های BAX، BAK و کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های MCF-۷ آلوده شده با NDV جداسازی شده از طیور صنعتی از تکنیک Real-time RT-PCR استفاده شد. پس از اتمام چرخه‌های حرارتی PCR، بر روی محصول PCR آنالیز منحنی ذوب انجام شد. منحنی ذوب رسم شده توسط دستگاه که براساس ویژگی‌های ذوب

معنی دار نبود ( $p > 0.05$ ). افزایش بیان ژنهای BAX و کاسپاز ۹ در سلولهای توموری آلوده شده با NDV از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۲).

۲/۴۴ برابر افزایش یافت ( $p = 0.01$ ). بیان ژن کاسپاز ۳ در سلولهای توموری آلوده شده با NDV نیز ۱/۴۹ برابر افزایش نشان داد ولی این افزایش از نظر آماری



شکل ۲. میزان بیان ژنهای مرتبط با آپوپتوز در سلولهای MCF-۷ کنترل و سلولهای MCF-۷ آلوده شده با NDV جداسازی شده از طیور صنعتی با تکنیک Real-time RT-PCR

### بحث و نتیجه گیری

مطالعات از NDV تغییر ژنتیکی داده شده به عنوان واکسن ویروسی در درمان تومور استفاده شده است (۹، ۴۴، ۵۱، ۵۲). درج ژن ICOS (Inducible T cell

NDV به عنوان یک ویروس تخریب گر تومور طبیعی معرفی شده است که به طور مؤثری می تواند انواع مختلف سلولهای توموری را از بین ببرد. در تعدادی از

سیتو توکسی سیتی با واسطه استرس شبکه اندوپلاسمی مستقل از p۵۳ یک سویه NDV (MTH-68/H) را در رده‌های سلول توموری نشان دادند (۱۵). Lazar و همکاران نشان دادند فعالیت انکولیتیک سویه NDV-HUJ در سلول‌های ملانومای مقاوم به شیمی‌درمانی وابسته به فعالیت پرو آپوپتوتیک ممانعت کننده از پروتئین آپوپتوز لیوین (Livin apoptosis protein) است (۲۷). Mansour و همکاران اعلام کردند ویژگی انکولیتیک NDV به واسطه آن است که ویروس به صورت انتخابی سلول‌های مقاوم به آپوپتوز را آلوده می‌کند (۲۸). Koks و همکاران نشان دادند ویروس درمانی با NDV از طریق ایجاد مرگ سلولی ایمنونژنیک در گلیومای ارتوتوپیک زنده‌مانی (Survival) طولانی مدت و حافظه ایمنی اختصاصی تومور ایجاد می‌کند (۲۴). Caudrado-Castano و همکاران نشان دادند افزایش خصوصیات پرو آپوپتوتیک NDV منجر به افزایش تحلیل تومور در مدل‌های موش سینژنیک (Syngeneic) می‌شود (۸).

در مطالعات ذکر شده برای بررسی القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری آلوده به ویروس از تکنیک‌های مختلفی استفاده شده است از جمله بررسی افزایش پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک و کاهش پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک در سلول‌ها با فلوسیتومتری یا وسترن بلات و همچنین ارزیابی سطح بیان ژن‌های این پروتئین‌ها در سلول‌ها با تکنیک Real-time RT-PCR. کارایی این تکنیک‌ها در تشخیص میزان آپوپتوز در سلول‌ها یکسان نیست. همچنین در سلول‌ها ممکن است تغییر در میزان پروتئین‌های ارزیابی شده یا بیان ژن‌های آنها به تنهایی مارکر خوبی برای مشخص کردن سلول‌های در حال آپوپتوز نباشد.

costimulator) در داخل تومور توسط NDV مهندسی ژنی شده منجر به افزایش القاء سلول‌های T اختصاصی تومور شده است (۵۰). از NDV تغییر ژنتیکی داده شده که ژن اینترلوکین ۲ (Interleukin-2) و لیگاند القاء کننده آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor necrosis factor-related apoptosis ligand) را به ژنوم ویروس اضافه کردند نیز برای درمان تومور استفاده شده است (۴). همچنین از درمان ترکیبی NDV، ریوکسی‌مب و شیمی‌درمانی با دوکسوروبیسین برای بدخیمی‌های خونی استفاده شده است (۳). با وجود این، افزایش کارایی این نوع رهیافت‌های درمانی برای استفاده از آنها در بیماران مبتلا به سرطان ضروری است (۶). پی بردن به مکانیسم‌های تخریب سلولی NDV می‌تواند در این زمینه مفید باشد.

در تعدادی از مطالعات علت تکثیر انتخابی NDV در سلول‌های توموری فقدان پاسخ ضد ویروسی معمول در سلول‌های توموری پیشنهاد شده است. اما نتایج مطالعات دیگر نشان داد برخی سلول‌های توموری با مسیرهای ضد ویروسی دست نخورده نیز توسط NDV کشته می‌شوند. برخی محققین نیز اعلام کردند فقدان آپوپتوز در سلول‌های توموری باعث می‌شود NDV به طور انتخابی در سلول‌های تومور تکثیر یابد. همچنین طبق یافته‌های دیگر به نظر می‌رسد فعالیت ضد توموری ویروس از طریق القاء آپوپتوز یا از طریق مرگ سلولی با واسطه پاسخ ایمنی باشد (۱۶).

Chia و همکاران پایداری عفونت ویروسی در سلول‌های سرطانی عفونی شده با NDV را نشان داده‌اند (۱۰). Elankumaran و همکاران گزارش کردند NDV سلول‌های سرطانی را از طریق هر دو مسیر داخلی و مسیر خارجی وابسته به کاسپاز آپوپتوز تخریب می‌کند (۱۳). Fabian و همکاران



- (2014). Genetically engineered Newcastle disease virus expressing interleukin-2 and TNF-related apoptosis-inducing ligand for cancer therapy. *Cancer biology & therapy*, **15**:1226-1238.
5. Bolchon, S. & Demeret, C. (2003). The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*, **85**:813-819.
  6. Bonab, S. & Khansari, N. (2017). Virotherapy with Newcastle disease virus for cancer treatment and its efficacy in clinical trials. *MOJ Immunology*, **5**:00176.
  7. Brown, J.J., Short, S.P., Stencel-Baerenwald, J., Urbanek, K., Pruijssers, A.J., McAllister, N., Ikizler, M., Taylor, G., Aravamudhan, P., Khomandiak, S. & Jabri, B. (2018). Reovirus-induced apoptosis in the intestine limits establishment of enteric infection. *Journal of virology*, **92**:e02062-17.
  8. Cuadrado-Castano, S., Sanchez-Aparicio, M.T., García-Sastre, A. & Villar, E. (2015). The therapeutic effect of death: Newcastle disease virus and its antitumor potential. *Virus research*, **209**:56-66.
  9. Cheng, X., Wang, W., Xu, Q., Harper, J., Carroll, D., Galinski, M. S., ...& Jin, H. (2016). Genetic modification of oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy. *Journal of virology*, **90**:5343-5352.
  10. Chia, S. L., Yusoff, K. & Shafee, N. (2014). Viral persistence in colorectal cancer cells infected by Newcastle disease virus. *Virology journal*, **11**:91.
  11. Coffey, M. C., Strong, J. E., Forsyth, P. A. & Lee, P. W. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science*, **282**:1332-1334.
  12. Cuadrado-Castano, S., Ayllon, J., Mansour, M., De La Iglesia-Vicente, J., Jordan, S., Tripathi, S., ...& Villar, E. (2015). Enhancement of the proapoptotic properties of newcastle

با توجه به این که هنوز مکانیسم‌های دقیق از بین رفتن سلول‌های توموری توسط سویه‌های مختلف NDV مشخص نشده است و القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری یکی از مکانیسم‌های مرگ سلول‌های توموری آلوده به برخی سویه‌های ویروس NDV گزارش شده است، در این مطالعه توانایی سویه NDV جداسازی شده از طیور صنعتی در القاء بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز در سلول‌های توموری MCF-۷ ارزیابی شد. در بررسی بیان ژنی افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های BAX و کاسپاز ۹ در سلول‌های توموری آلوده به ویروس در مقایسه با سلول‌های توموری کنترل مشاهده شد در حالی که تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های BAK، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ بین سلول‌های توموری آلوده به ویروس و سلول‌های توموری کنترل مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد NDV جداسازی شده از طیور صنعتی با افزایش بیان ژن‌های BAX و کاسپاز ۹ که در شروع مسیر داخلی آپوپتوز نقش دارند می‌تواند شروع مسیر داخلی آپوپتوز را در سلول‌های توموری پستان القاء کند.

#### منابع

1. Aldous, E.W. & Alexander DJ. (2001). Detection and differentiation of newcastle disease virus (avian paramyxovirus Type 1). *Avian Pathol.* **30**:117-128.
2. Alexander, D.J. (2003). Newcastle disease and other avian Paramyxoviruses infections. In: Saif YM, et al. (Eds.), *Iowa State University Press, Ames, USA*, p. 63-99.
3. Al-Shammari, A. M., Rameez, H. & Al-Tae, M. F. (2016). Newcastle disease virus, rituximab, and doxorubicin combination as anti-hematological malignancy therapy. *Oncolytic virotherapy*, **5**:27.
4. Bai, F. L., Yu, Y. H., Tian, H., Ren, G. P., Wang, H., Zhou, B., ...& Li, D. S.

- additive cell death in glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. *Klinische Pädiatrie*, **232**.
21. ICTV. 2019. Virus Taxonomy: 2019 Release. talk.ictvonline.org.
  22. Jin, Z. & El-Deiry, W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*, **4**:147-171.
  23. Kerr, JF. Wyllie, AH. Currie, AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. **26**:239-257.
  24. Koks, C. A., Garg, A. D., Ehrhardt, M., Riva, M., Vandenberk, L., Boon, L., ...& Van Gool, S. W. (2015). Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *International journal of cancer*, **136**:E313-E325.
  25. Lai, I.H., Chang, C.D. & Shih, W.L. (2019). Apoptosis Induction by Pseudorabies Virus via Oxidative Stress and Subsequent DNA Damage Signaling. *Intervirology*, **62**:105-112.
  26. Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M. & Wesselborg, S. (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell*, **14**:277-287.
  27. Lazar, I., Yaacov, B., Shiloach, T., Eliahoo, E., Kadouri, L., Lotem, M., ...& Ben-Yehuda, D. (2010). The oncolytic activity of Newcastle disease virus NDV-HUJ on chemoresistant primary melanoma cells is dependent on the proapoptotic activity of the inhibitor of apoptosis protein Livin. *Journal of virology*, **84**:639-646.
  28. Mansour, M., Palese, P. & Zamarin, D. (2011). Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. *Journal of virology*, **85**:6015-6023.
  - disease virus promotes tumor remission in syngeneic murine cancer models. *Molecular cancer therapeutics*, **14**:1247-1258.
  13. Elankumaran, S., Rockemann, D. & Samal, S. K. (2006). Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *Journal of virology*, **80**:7522-7534.
  14. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, **35**:495-516.
  15. Fábíán, Z., Csatory, C. M., Szeberényi, J. & Csatory, L. K. (2007). p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines. *Journal of virology*, **81**:2817-2830.
  16. Farashi-Bonab, S. & Khansari, N. (2017). Immunobiology of anticancer virotherapy with Newcastle disease virus in cancer patients. *Vaccin Res Open J*, **1**:45-53.
  17. Fuller, C.M., Collins, M.S., Easton, A.J., & Alexander DJ. (2007). Partial characterisation of five cloned viruses differing in pathogenicity, obtained from a single isolate of pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1) following passage in fowls' eggs. *Arch Virol*. **152**:1575-1582.
  18. Gohm, D.S., Thür, B. & Hofmann, M.A. (2000). Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. *Avian Pathology*, **29**(2):143-152.
  19. Han, X., Tian, Y., Guan, R., Gao, W., Yang, X., Zhou, L. & Wang, H. (2017). Infectious bronchitis virus infection induces apoptosis during replication in chicken macrophage HD11 cells. *Viruses*, **9**:p.198.
  20. Huynh, A.K.D., Walch-Rückheim, B., Smola, S. & Graf, N. (2020). Combined infection with oncolytic viruses (OVs) induces synergistic and

- Myxoma Virus. *Journal of Clinical Medicine*, **9**:p.171.
38. Salvesen GS, Dixit VM. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91**:443-446.
  39. Southam, C. M. & Moore, A. E. (1952). Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to Egypt 101 virus. *Cancer*, **5**:1025-1034.
  40. Strong, J. E., Coffey, M. C., Tang, D., Sabinin, P. & Lee, P. W. (1998). The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *The EMBO journal*, **17**:3351-3362.
  41. Suarez, D.L., Miller, P.J., Koch, G., Mundt, E. & Rautenschlein, S. (2020). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirus infections. *Diseases of poultry*, 109-166.
  42. Thompson, CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**:1456-1462.
  43. Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, **281**:1312-1316.
  44. Vigil, A., Martinez, O., Chua, M. A. & García-Sastre, A. (2008). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector for cancer therapy. *Molecular Therapy*, **16**:1883-1890.
  45. Vijayakumar, G. & Zamarin, D. (2020). Design and production of newcastle disease virus for intratumoral immunomodulation. In *Oncolytic Viruses* (133-154). Humana, New York, NY.
  46. Watkins, S. J., Mesyanzhinov, V. V., Kurochkina, L. P. & Hawkins, R. E. (1997). The 'adenobody' approach to viral targeting: specific and enhanced adenoviral gene delivery. *Gene therapy*, **4**:1004-1012.
  47. Woo, Y., Reid, V., Kelly, K.J., Carlson, D., Yu, Z. & Fong, Y. (2020). Oncolytic Herpes Simplex Virus Prevents Premalignant Lesions from
  29. Marcato, P., Shmulevitz, M., Pan, D., Stoltz, D. & Lee, P. W. (2007). Ras transformation mediates reovirus oncolysis by enhancing virus uncoating, particle infectivity, and apoptosis-dependent release. *Molecular therapy*, **15**:1522-1530.
  30. Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annual review of immunology*, **36**, 489-517.
  31. Nanthakumar, T., Katari, R.S., Tieari, A.K., Butchaiah, G. & Kataria, J.M. (2000). Pathotyping of newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Commun.*, **24**:275-286.
  32. Nainu, F., Shiratsuchi, A. & Nakanishi, Y. (2017). Induction of apoptosis and subsequent phagocytosis of virus-infected cells as an antiviral mechanism. *Frontiers in immunology*, **8**:p.1220.
  33. Niavarani, S.R., Lawson, C., Boudaud, M., Simard, C. & Tai, L.H. (2020). Oncolytic vesicular stomatitis virus-based cellular vaccine improves triple-negative breast cancer outcome by enhancing natural killer and CD8+ T-cell functionality. *Journal for immunotherapy of cancer*, **8**.
  34. Niemann, J. & Kühnel, F. (2017). Oncolytic viruses: adenoviruses. *Virus Genes*, **53**:700-706.
  35. Nichols, J.E., Niles, J.A., Fleming, E.H. & Roberts, N.J. (2019). The role of cell surface expression of influenza virus neuraminidase in induction of human lymphocyte apoptosis. *Virology*, **534**:80-86.
  36. Park, S. H., Breitbach, C. J., Lee, J., Park, J. O., Lim, H. Y., Kang, W. K., ... & Patt, R. (2015). Phase 1b trial of biweekly intravenous Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus in colorectal cancer. *Molecular Therapy*, **23**:1532-1540.
  37. Rahman, M.M. & McFadden, G. (2020). Oncolytic Virotherapy with

- Progressing to Cancer. *Molecular Therapy-Oncolytics*, **16**:1-6.
48. Yaghchi, C. A., Zhang, Z., Alusi, G., Lemoine, N. R. & Wang, Y. (2015). Vaccinia virus, a promising new therapeutic agent for pancreatic cancer. *Immunotherapy*, **7**:1249-1258.
49. Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F. & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, **7**:85.
50. Zamarin, D., Holmgaard, R. B., Ricca, J., Plitt, T., Palese, P., Sharma, P., ...& Allison, J. P. (2017). Intratumoral modulation of the inducible co-stimulator ICOS by recombinant oncolytic virus promotes systemic anti-tumour immunity. *Nature communications*, **8**:1-14.
51. Zamarin, D., Vigil, A., Kelly, K., García-Sastre, A. & Fong, Y. (2009). Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy. *Gene therapy*, **16**:796-804.
52. Zhao, H., Janke, M., Fournier, P. & Schirmacher, V. (2008). Recombinant Newcastle disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. *Virus research*, **136**:75-80.

## Isolation of Newcastle disease virus from industrial poultry and assessing its ability to induce expression of apoptosis-related genes in MCF-7 tumor cells

Arash Kalantari<sup>1</sup>, Samad Farashi Bonab<sup>2\*</sup>, Hadi Keyvanfar<sup>3</sup>

1- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 26 May 2020

Accepted: 25 August 2020

### Abstract

Newcastle disease virus has been investigated in several studies as an oncolytic virus to treat human tumors. However, precise mechanism of tumor cell killing by this virus is unknown. The aim of this study was isolation of Newcastle disease virus from industrial poultry and examination of its ability to induce expression of the extrinsic and the intrinsic pathways of apoptosis-related genes in human breast carcinoma cells. Newcastle disease virus was isolated from industrial poultry by culture in embryonated chicken eggs and then identified by haemagglutination test and RT-PCR technique. MCF-7 breast carcinoma cells were infected with the isolated virus in vitro. After RNA extraction and cDNA synthesis, gene expression levels of BAX, BAK, caspases-3, -8, and -9 were assessed in the virus-infected tumor cells using real-time RT-PCR technique. PCR data analysis showed that gene expression levels of BAX and caspase-9 were significantly higher in virus-infected tumor cells than that in control tumor cells. Gene expression levels of BAK and caspases-3 and -8 were not significantly altered in virus-infected tumor cells in comparison with control tumor cells. These results suggest that Newcastle disease virus isolated from industrial poultry can trigger the intrinsic pathway of apoptosis in MCF-7 tumor cells.

**Keywords:** Newcastle disease virus, Tumor, Apoptosis, Extrinsic pathway of apoptosis, Intrinsic pathways of apoptosis, Gene expression

\*Corresponding author: Samad Farashi Bonab

Address: Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: +982188953009

Email: Farashibs@yahoo.com