

## Metastasis Inhibition through Down Regulation of PlGF in Gastric Adenocarcinoma (AGS) Cells

Ameneh Sharifi<sup>1</sup>, Mansour Aminzadeh Bukani<sup>2</sup>, Hassan Akrami<sup>2\*</sup>, Mohammad Rahbani Nobar<sup>3</sup>, Somayeh Havasi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Ahar Branch of Azad University, Ahar, Iran

<sup>2</sup>Department of Biology, School of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

<sup>3</sup>Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

Received: 17 Mar, 2013

Accepted: 6 May, 2013

### Abstract

**Background and Objectives:** Placental Growth Factor (PlGF) is a member of Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) family, which can directly act on angiogenesis, tumor cells motility, tumor metastasis, growth and tumor survival. The purpose of this study was to investigate the preventive effect of siRNA on PlGF gene in gastric cancer cells.

**Materials and Methods:** In this experimental study, gastric adenocarcinoma cells (AGS) with 40 picomol concentration of small interfering RNA (siRNA) related to PlGF gene and cellular migration test was carried out, using wound healing model.

**Results:** PlGF gene 24 and 48 hours after of treatment, expression inhibition showed that migration of AGS cells was prevented compared with control condition, but in 72 hours' time interval, treatment samples showed migration reduction more than control sample.

**Conclusion:** According to these results, reduction of PlGF gene expression may prevents AGS cells migration and metastasis.

**Keyword:** Placenta growth factor (PlGF), Gastric adenocarcinoma cells (AGS), Metastasis

\*Corresponding author:

E-mail: A\_sharifi\_genetic@yahoo.com

## مقاله پژوهشی

### مهار متاستاز از طریق کاهش بیان PIGF در سلول های آدنوکارسینومای معده (AGS)

آمنه شریفی: گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد واحد اهر، اهر، ایران  
منصور امین زاده بوکانی: گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران  
حسن اکرمی: گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، نویسنده رابط:

E-mail: hassan\_akrami@yahoo.com

محمد رهبانی نوبر: گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
سمیه هواسی: گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد واحد اهر، اهر، ایران

دریافت: ۹۱/۱۲/۲۷ پذیرش: ۹۲/۲/۱۶

#### چکیده

**زمینه و اهداف:** فاکتور رشد جفتی (Placental Growth Factor, PIGF) از اعضای خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) می باشد. که می تواند بطور مستقیم در رگزایی، تحریک سلول های توموری، متاستاز تومور، رشد و بقای تومور عمل کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاري siRNA بر ژن فاکتور رشد جفتی در سلول های سرطان معده می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، سلول های آدنوکارسینومای معده (Gastric adenocarcinoma cells, AGS) با غلظت ۴۰ پیکومول siRNA مرتبط با ژن فاکتور رشد جفتی تیمار و تست مهاجرت سلولی با استفاده از مدل ترمیم زخم انجام شد.

**یافته ها:** ژن PIGF بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار مهار بیان نشان داد که مهاجرت سلولهای سرطان معده در مقایسه با حالت کنترل، مهار گردید ولی در بازه زمانی ۷۲ ساعت نمونه تیمار به نسبت نمونه کنترل کاهش مهاجرت را نشان داد.

**نتیجه گیری:** با توجه به این نتایج، کاهش فاکتور رشد جفتی ممکن است در مهار مهاجرت سلولهای و متاستاز تاثیر داشته باشد.

**کلید واژه ها:** فاکتور رشد جفتی، سلولهای آدنوکارسینومای معده، متاستاز

#### مقدمه

به بافت های مجاور، فرایند تهاجم را انجام می دهند (۲). متاستاز، یک فرآیند پیچیده ی پاتولوژیکی است. سلول های سرطانی برای انجام متاستاز باید مراحل زیر را بگذرانند: در ابتدا سلول های سرطانی از توده تومور اولیه جدا می شود و سپس سلول های توموری به داخل عروق خونی مهاجرت می یابند و فقط آن دسته از سلول های زنده ی موجود در داخل خون به خارج از عروق خونی منتقل می یابند و در پایان در یک مکان ثانویه تکثیر پیدا می کنند (۳). لازم به ذکر است، که سلول های تومور بدون دسترسی

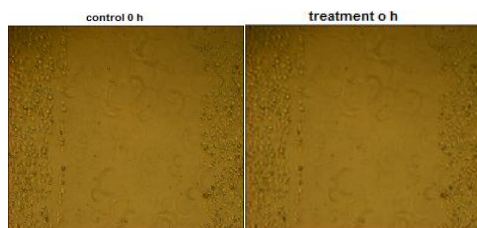
متاستاز، گسترش سلول های بدخیم به محل های دورتر بدن، و القا کننده تومورهای ثانویه در سراسر بدن می باشد و عامل اصلی اکثر مرگ های سرطانی می باشد (۱). سلول های متاستاز کننده، ویژگی های مشترک و متعددی دارند از جمله: برای رشد خود به عامل های رشد نیاز ندارند، زیرا به شکل غیر کنترل شده تکثیر می شوند، نسبت به عامل های مهار کننده رشد حساسیت ندارند، از مرگ برنامه ریزی شده سلول، فرار می کنند، توانایی تکثیر فراوان داشته و نامیرا هستند، قادر به انجام فرایند رگزایی هستند، با حمله

پیکومول siRNA در ۱۰۰ میکرولیتر Transfection Medium رقیق شده و به آرامی چند بار مخلوط می شود، مقدار ۴ میکرولیتر (siRNA Transfection Reagent) در ۱۰۰ میکرولیتر Transfection Medium مخلوط شده، سپس ترکیب PIGF-siRNA و Reagent رقیق شده با یکدیگر مخلوط شده و ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس siRNA PIGF- Reagent ایجاد شود. قبل از اضافه کردن کمپلکس تشکیل شده، محیط کشت سلول ها را خارج کرده و با PBS IX شسته می شود، سپس مقدار ۸۰۰ میکرولیتر Transfection Medium به هر چاهک اضافه می گردد، کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول ها اضافه شده و پلیت چندبار به آرامی تکان داده می شود تا کمپلکس در سطح پلیت کاملاً پخش شود، سپس پلیت در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و ۵ الی ۷ ساعت بعد محیط کشت RPMI، سرم و آنتی بیوتیک به آن اضافه می گردد.

پس از ۲۴ ساعت از کشت (سیصد هزار سلول در هر چاهک) که سلول ها به کف پلیت چسبیده و به تراکم ۸۰ درصد رسیدند با استفاده از اسکالپل استریل خراشی در وسط لایه سلولی کف پلیت ایجاد شد و سلول های جدا شده به همراه محیط کشت قدیمی به آرامی از چاهک ها خارج شده و پس از شستشو با PBS، ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید حاوی ۳ درصد سرم FBS به چاهک ها اضافه شد و پس از ۱ تا ۲ ساعت siRNA به خانه ها اضافه شد و یک چاهک هم به عنوان کنترل بدون اضافه کردن تیمار در نظر گرفته شد. نتایج چاهک ها با میکروسکوپ عکس برداری شد.

### یافته ها

مهاجرت سلول های کنترل و تیمار با غلظت ۴۰ پیکومول siRNA علیه PIGF با میکروسکوپ بررسی شد. نتایج در شکل های ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از ایجاد شکاف در سلول های سرطان معده، مهاجرت سلول ها از لبه شکاف به محل شکاف، نمونه های تیمار شده با نمونه کنترل مقایسه شد. در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ایجاد شکاف در نمونه کنترل این مهاجرت دیده می شود و در بازه ۷۲ ساعت نمونه کنترل تمام سطح شکاف را پر می کند ولی در نمونه تیمار مهاجرت سلول ها به محل شکاف مهار گردید و در ۷۲ ساعت در نمونه تیمار کاهش مهاجرت مشاهده گردید.



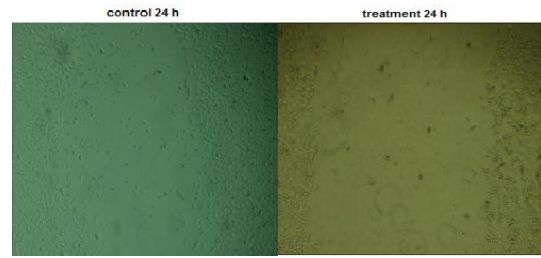
شکل ۱: مدل ترمیم زخم در زمان صفر در نمونه های کنترل و تیمار با siRNA PIGF-

به عروق خونی نمی توانند متاستاز نمایند (۴). رشد تومورها به طور کامل به ایجاد رگ های جدید و رفع نیازهای تغذیه ای تومور بستگی دارد. گسترش سیستم عروقی، احتمال تهاجم سلولهای توموری را از طریق وارد شدن به جریان خون و انتشار به اندام های دیگر افزایش می دهد. سلول های توموری و سلول های التهابی مثلاً ماکروفاژها فاکتورهای ترشح می کنند، که باعث جوانه زدن رگهای قبلی و آنژیوژنز می شود این مواد فاکتورهای آنژیوژنیک نامیده شدند، سپس فاکتورهای مذکور با اتصال به گیرنده های خود واقع بر روی سلول های اندوتلیال، منجر به فعال شدن آنها می شوند (۵). فاکتور رشد اندوتلیال عروقی یکی از تنظیم کننده های مهم در رگ زایی و در رشد سلول های اندوتلیال عروقی می باشد (۶). فاکتور رشد جفتی، عضوی از خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی می باشد که در سال ۱۹۹۱ از کتابخانه cDNA جفت جداسازی فاکتور رشد جفتی در بسیاری از بافت ها، از جمله سینه، معده، پروستات، قلب، ریه، شبکه چشم، تیروئید، و پوست تشخیص داده شده است (۷). فاکتور رشد جفتی که در رگ زایی، تکوین جنین و توسعه متاستاز نقش دارد (۸). گیرنده اختصاصی فاکتور رشد جفتی، VEGFR1 می باشد (۹). VEGFR1 در سلول های اندوتلیال، مونوسیت ها، ماکروفاژها (۱۰)، سلول های بنیادی خون ساز (۱۱)، و در بعضی از سلول های توموری بیان می شود. افزایش بیان PIGF به عنوان محرک رشد بعضی از تومورها گزارش شده است (۱۲). ژن PIGF به نام (PGF) بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۴ قرار دارد (۱۳). در سرطان سینه، PIGF در بسیاری از فعالیت های سلولی که متاستاز را توسعه می دهد، شامل: میان کنش سلول های اندوتلیالی برای استقرار تولیدات خونی، افزایش تهاجم و انتقالات خونی دخالت دارد (۱۴). در مطالعات انجام شده بر روی موش افزایش سطح بیان PIGF در موش ها منجر به افزایش رگ زایی و متاستاز شده است. و همچنین کاهش بیان PIGF در رشد عروقی، ترمیم زخم ها، التهاب و در رشد توده های سرطانی اختلال ایجاد می کند (۱۵). در این مطالعه با استفاده از تکنولوژی siRNA علیه ژن PIGF در مدل ترمیم زخم، میزان مهاجرت سلول های سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. بکارگیری siRNA کارآمد با اثر مهاری بالا در شناسایی نقش ژن PIGF در فرایند متاستاز مفید می باشد.

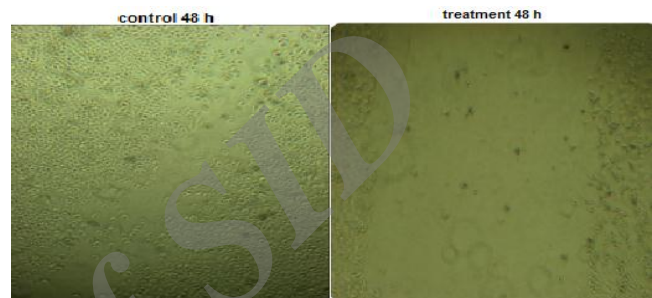
### مواد و روش ها

سلول های رده آدنوکارسینومای معده (AGS) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران، به تعداد سیصد هزار سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه ای، در محیط کشت RPMI 1640 (SIGMA) دارای ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (Fetal bovin serum, BIOCROM AG)، پنی سیلین صد میکرو یونیت در میلی لیتر و استرپتومایسین صد میکروگرم در میلی لیتر (SIGMA) تحت شرایط ۵ درصد CO<sub>2</sub> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند (۸). برای ترانسفکشن سلول های سرطان معده با siRNA علیه ژن PIGF (Santa Cruz)، کمپلکس siRNA PIGF- Reagent به شرح ذیل آماده گردید: مقدار ۴۰

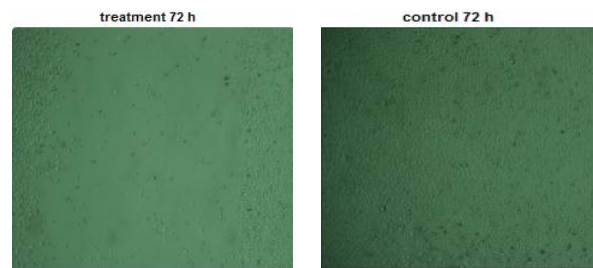
این آزمایش، می‌توان نتیجه گرفت که siRNA علیه ژن PIGF نیمه عمر کوتاهی در داخل سلول دارد، و بمدت ۴۸ ساعت در سلول پایدار می‌باشد و می‌تواند بیان ژن را مهار کند. اما در ۷۲ ساعت پایداری آن کاهش می‌یابد و سلول می‌تواند ژن PIGF را بیان کند. کاهش بیان ژن PIGF در مهار مهاجرت سلول های سرطان معده و متاستاز تاثیر دارد. در مطالعه‌ای که توسط Taylor و همکاران انجام شد، سلول های سرطان پستان انسانی MDA-MB-231 را با غلظت (۱۰M) PIGF تیمار دادند، بعد از گذشت ۲۰ ساعت مهاجرت بطور کامل انجام گرفت، و شکاف پر شد. این آزمایش در دو لاین سلولی دیگر MCF-7 و MDA-MB-468 نیز انجام گرفت. در رده سلولی MCF-7 بعد از ۲۴ ساعت شکاف پر شد ولی در رده سلولی MDA-MB-468 هیچ پاسخی در مقابل تیمار با PIGF دیده نشد. در مطالعه حاضر نمونه تیمار با siRNA علیه PIGF در بازه ۲۴ و ۴۸ به علت کاهش بیان ژن PIGF مهار مهاجرت سلولی مشاهده شد ولی در ۷۲ ساعت مهاجرت سلولی مشاهده شد مطالعه حاضر و آزمایش Ap Taylor و همکاران، هم از نظر لاین های سلولی استفاده شده، و هم از نظر نوع تیمار بکار برده شده متفاوت می باشند ولی نتایج این دو مطالعه حاکی از این است که PIGF در مهاجرت سلولی نقش مهمی دارد (۱۶). در بررسی دیگر که توسط Carlos Bais و همکاران انجام گرفت، سلول های موش های ماده C57BL/6 یا Db/Db را با دو آنتی بادی بر علیه PIGF (C9.V2 و 7A10) تیمار کردند این مهارکننده ها مانع از اتصال PIGF به رسپتور اختصاصی VEGFR1 می‌گردد که در اینصورت این لیگاند به تنهایی بدون اتصال به رسپتورش عملکردش را نمی‌تواند انجام دهد و مهار مهاجرت در مدل Wound healing را در این سلول ها مشاهده شد. که نتایج آنها مشابه مطالعه حاضر است، با این تفاوت که در تحقیق Carlos Bais و همکاران از سلول های موش و از آنتی بادی ضد PIGF استفاده شد در حالی که در تحقیق حاضر از siRNA علیه PIGF استفاده کردیم (۱۷). در تحقیق دیگری که توسط Christian fisher و همکاران انجام شد با استفاده از آنتی بادی  $\alpha$ PIGF رشد تومور و درصد مهاجرت سلولهای توموری در سلولهای اندوتلیال را به میزان ۵۵ تا ۶۶٪ مهار کردند.  $\alpha$ PIGF اتصال PIGF به گیرنده اختصاصی VEGFR1 را مهار می‌کند. آنتی بادی  $\alpha$ PIGF بسته به میزان غلظت مورد استفاده متاستاز تومورهای PANC02، گره های لنفاوی و مناطق دیگر از بدن را مهار می‌کند. که مشابه مطالعه حاضر است و نتیجه مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. با این تفاوت که نوع سلول های مورد آزمایش متفاوت ولی هر دو نوع رده سلولی سرطانی می‌باشند (۱۸). در مطالعه دیگر که توسط Kou - Gi - Shyu و همکارانش انجام گرفت با استفاده از siRNA علیه ژن PIGF سلول های MSCs را تیمار دادند و مهار مهاجرت این سلول ها را گزارش نمودند که مشابه مطالعه حاضر است و نتیجه مطالعه حاضر را تأیید می‌کند (۱۹).



شکل ۲: اثر مهار مهاجرت توسط PIGF- siRNA به ترتیب از چپ به راست: نمونه کنترل ۲۴ ساعت پس از ایجاد زخم در سلول های سرطان معده و نمونه تیمار با غلظت ۰۴ پیکومول از PIGF-siRNA



شکل ۳: اثر مهار مهاجرت توسط PIGF- siRNA به ترتیب از چپ به راست، نمونه کنترل ۴۸ ساعت پس از ایجاد زخم در سلول های سرطان معده نمونه تیمار با غلظت ۰۴ پیکومول از PIGF-siRNA



شکل ۴: اثر مهار مهاجرت توسط PIGF- siRNA به ترتیب از چپ به راست: نمونه کنترل ۷۲ ساعت پس از ایجاد زخم در سلول های سرطان معده، نمونه تیمار با غلظت ۰۴ پیکومول از PIGF- siRNA

## بحث

siRNA ها، از این جهت که بطور اختصاصی بیان ژن هدف را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند، مورد توجه می‌باشند. در این تحقیق از siRNA علیه ژن PIGF برای بررسی نقش PIGF در فرآیند متاستاز استفاده گردید، و مشاهده شد که با مهار ژن PIGF در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، مهاجرت سلول ها در مقایسه با نمونه کنترل مهار می‌شود، اما در بازه ۷۲ ساعت این اثر مهار کاهش یافته و در نتیجه مهاجرت را در سلول های تیمار شده با siRNA علیه ژن PIGF می‌توان مشاهده نمود. با توجه به داده‌های

## نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات گذشته، می‌توان اظهار داشت که فاکتور رشد، PIGF ممکن است در مهاجرت سلول های سرطانی نقش داشته باشد.

## پیشنهادات

به این ترتیب در مطالعات آینده برای نتیجه گیری بهتر می‌توان این مطالعه را با لاین های سلولی دیگر نیز انجام داد، از آنتی بادی علیه ژن PIGF برای مقایسه با نتایج siRNA علیه PIGF در لاین سلولی سرطان معده استفاده شود و تاثیر کاهش بیان ژن PIGF به

واسطه siRNA را برگزیده اختصاصی آن (VEGFR1) بررسی شود.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و همکاری بی دریغ جناب آقای دکتر اکرمی از دانشگاه رازی، جناب آقای دکتر رهبانی از دانشگاه علوم پزشکی تبریز و همکارانم در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه رازی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

## References

- Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *The New England Journal of Medicine* 2008; **359**(26): 2814–2823.
- Fidler I. Tumor Heterogeneity and the Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Cancer Res* 1978; **38**(9): 2651-2660.
- Coman DR. Mechanisms Responsible for the Origin and Distribution of Blood-borne Tumor Metastases. A Review *Cancer Research* 1953; **13**: 397-404.
- Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999; **59**(6): 1295-1300.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med* 1971; **285**(21): 1182-1186.
- Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. Role of angiogenesis in solid tumours. An overview. *Eur J Int Med* 2009; **20**: 663–671.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**(20): 9267-9271.
- Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, et.al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997; **99**(11): 2625-2634.
- Davis-Smyth T, Presta LG, Ferrara N. Mapping the charged residues in the second immunoglobulin-like domain of the vascular endothelial growth factor/placenta growth factor receptor Flt-1 required for binding and structural stability. *J Biol Chem* 1998; **273**: 3216-3222.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; **18**(1): 4-25.
- Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 1997; **124**(10): 2039-2048.
- Bellamy WT. Vascular endothelial growth factor as a target opportunity in hematological malignancies. *Curr Opin Oncol* 2002; **14**(6): 649-656.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, et.al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993; **8**(4): 925-931.
- Taylor AP, Rodriguez M, Adams K, Goldenberg DM, Blumenthal RD. Altered tumor vessel maturation and proliferation in placenta growth factor-producing tumors: potential relationship to post-therapy tumor angiogenesis and recurrence. *Int J Cancer* 2003; **105**(2): 158-164.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et.al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; **7**(5): 575-583.
- Taylor AP, Leon E, Goldenberg DM. Placental growth factor (PIGF) enhances breast cancer cell motility by mobilising ERK1/2 phosphorylation and cytoskeletal. *British Journal of Cancer* 2010; **103**(1): 82–89.
- Carlos Bais, Xiumin Wu, Jenny Yao, Suya Yang, Yongping Crawford, Krista McCutcheon, et al. PIGF

- Blockade Does Not Inhibit Angiogenesis during Primary Tumor Growth. *Cell* 2010; **141**(1): 166-177.
18. Christian Fischer, Bart Jonckx, Massimiliano Mazzone, Serena Zacchigna, Sonja Loges, Lucia Pattarini, et al. Anti-PlGF Inhibits Growth of VEGF(R)-Inhibitor-Resistant Tumors without Affecting Healthy Vessels. *Cell* 2007; **131**(3): 463-475.
19. Shyu KG, Hung HF, Wang BW, Chang H. Hyperbaric oxygen induces placental growth factor expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Life Sciences* 2008; **83**(1-2): 65-73.

Archive of SID