

Induction of Continuous Expression of Cyclooxygenase -2 in Human Breast Cancer Cell Line Using COX-2 cDNA Plasmid Transfection

Saeedeh Vahedi¹,
BiBi Fatemeh Kalalinia²,
Zahra Noormohamadi³,
Fatemeh Mosaffa⁴,
Javad Behravan⁵

¹ MSc in Genetics, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵ Professor, Biotechnology Research Center, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received December 13, 2015 Accepted June 19, 2017)

Abstract

Background and purpose: One of the major problems in chemotherapy is resistance to anti-cancer drugs. Recent studies have demonstrated a relationship between cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and progression of multidrug resistance (MDR). One of the proteins involved in drug resistance is ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) that is often overexpressed in patients with cancer. This study was performed to develop the MCF7 and MCF7/MX human breast cancer cell line which continuously expressed COX-2 in order to evaluate the effect of induction of COX-2 expression on ABCG2 expression.

Materials and methods: For this purpose, a plasmid containing the sequence of cyclooxygenase-2 was cloned in *E. coli*. The purified plasmid was then transferred into the MCF7 and MCF7/MX cell lines by transfection process. Finally, the protein content of transfected cells were extracted and analyzed by Western blotting. The COX-2 expression was compared between transfected cells.

Results: The results showed that COX-2 protein levels were the highest in MCF7 cells transfected with a DNA and Fusion 6 ratio of 3:1 and the medium containing gentamicin added after 24 hours. Also, compared to the control cell line, in MCF7/MX cells the expression of COX-2 gene increased in transfected cells with a DNA and Fusion 6 ratio of 3:2 ($P < 0.05$).

Conclusion: In fact, the level of target gene expression may vary based on the cell line and culture conditions. Increase in the amount of DNA does not necessarily lead to increase in transfection efficiency.

Keywords: multidrug resistance, COX-2, MCF7 cell line

القاء بیان مداوم سیکلواکسیژناز-۲ در رده سلولی سرطان سینه از طریق ترانسفکشن آن ها با پلاسمید pSG5-COX-2

سعیده واحدی^۱بی بی فاطمه کلالی نیا^۲زهرا نورمحمدی^۳فاطمه مصفا^۴جواد بهروان^۵

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مشکلات عمده مربوط به شیمی درمانی، بروز مقاومت در برابر داروهای ضد سرطان است. گزارش های اخیر، وجود ارتباط میان بروز سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) (Cyclooxygenase-2) و توسعه فنوتیپ مقاومت چند دارویی (MDR) (Multidrug resistance) را نشان داده اند. COX-2 به طور مداوم در سلول ها بیان نمی شود، بلکه بیان آن توسط سیگنال های التهابی، فاکتورهای رشد و سیتوکین ها در محل التهاب القاء می شود. جهت بررسی ارتباط میان بیان COX-2 و ترانسپورترهای MDR در شرایط *in vitro* به سلول هایی نیاز است که این پروتئین را به صورت مداوم بیان کنند. این مطالعه با هدف القاء بیان مداوم COX-2 در رده سلولی سرطان پستان انسان MCF7 و MCF7/MX انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، پلاسمید حاوی توالی COX-2 در سلول های باکتری اشرشیا کولی کلون شد، سپس پلاسمید خالص سازی شده توسط فرآیند لیپوفکشن با کمک معرف فیوژن ۶ به رده سلولی MCF7 و MCF7/MX انتقال یافت. در آخر محتوی پروتئینی به دست آمده از سلول های ترانسفکت شده طی فرآیند وسترن بلات جداسازی و بیان پروتئین COX-2 در آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که سلول های MCF7 ترانسفکت شده ای که نسبت حجم فیوژن ۶ به DNA در آن ها ۳:۱ است و محیط حاوی جنتیسین ۲۴ ساعت بعد از پاساژ به آن ها افزوده شده است، بیش ترین میزان بیان پروتئین COX-2 را داشت. هم چنین در سلول های MCF7/MX نیز بیان COX-2 در سلول های ترانسفکت شده ای که نسبت حجم فیوژن ۶ به DNA در آن ها ۳:۲ بود، نسبت به کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$).

استنتاج: در حقیقت سطح بیان ژن مورد نظر بسته به رده سلولی و شرایط کشت متفاوت است و افزایش میزان DNA لزوماً منجر به افزایش کارایی ترانسفکشن نمی شود.

واژه های کلیدی: مقاومت چند دارویی، ژن COX-2، رده سلولی MCF7

مقدمه

یکی از مشکلات اساسی شیمی درمانی در سرطان، مقاومت در مقابل داروهای ضد سرطان است. ترانسپورترهای ABC (ATP-binding cassette) مسئول کاهش دسترسی سلول به داروها و بروز فنوتیپ

Email: KalaliniaF@mums.ac.ir

مؤلف مسئول: فاطمه کلالی نیا- مشهد، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۲۹

مقاومت دارویی هستند(۱).

سه پروتئین ABC اصلی که در مقاومت چند دارویی نقش دارند عبارتند از P- گلیکوپروتئین (ABCB1)، پروتئین همراه مقاومت چند دارویی ۱ (ABCC1) و پروتئین مقاوم سرطان پستان (ABCG2) (۲).

ABCG2 عضو دوم از زیر خانواده G ترانسپورترهای ABC است(۳). این پروتئین در بافت‌های نرمال مثل جفت، پانکراس، روده کوچک، روده بزرگ، سلول‌های کبدی، سینه و سلول‌های اپیتلیال سیاهرگ و مویرگ در بیش‌تر بافت‌ها حضور دارد(۴). بیان بالای ABCG2 همراه با سطح بالای مقاومت به عوامل مختلف ضد سرطانی است. بیان ABCG2 در تعداد زیادی از بدخیمی‌های هماتولوژیک و تومورهای جامد دیده شده است که نشان می‌دهد این ترانسپورتر نقش مهمی در مقاومت دارویی بالینی سرطان‌ها بازی می‌کند(۵،۶).

در مطالعات اخیر، نقش COX-2 در مقاومت دارویی از طریق افزایش بیان پروتئین‌های ترانسپورتر MDR مورد بررسی قرار گرفته است. سیکلواکسیژناز-2 یا همان پروستاگلاندین H سنتاز، آنزیمی است که در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین‌ها شرکت می‌کند(۷). COX-2 توسط سیگنال‌های التهابی، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها و در محل التهاب القاء می‌شود(۷،۸). این پروتئین در پیشرفت تومور از طریق تنظیم تکثیر سلولی، مهار آپوپتوز، کنترل مهاجرت سلولی، چسبندگی سلولی، تهاجم تومور و سرکوب پاسخ ایمنی نقش دارد(۹). در سال‌های اخیر گزارش شده است که COX-2 بیان ترانسپورتر ABC را تنظیم می‌کند و در پیشرفت فنوتیپ MDR نقش دارد. ارتباط القاء بیان COX-2 بر افزایش بیان MDR1 در سرطان سینه(۱۰)، کارسینوما سلول کبدی(۱۱) و لنفوما میلو بلاستی مزمن(۱۲) مشخص شده است.

در این مطالعه به هدف ایجاد رده‌های سلولی که پروتئین COX-2 را به صورت مداوم بیان کنند، کارایی

ترانسفکشن در رده سلولی سرطان سینه انسان MCF-7 و MCF7/MX بین سلول‌های ترانسفکت شده در شرایط مختلف کشت و با نسبت‌های مختلف معرف فیوژن ۶ به DNA مقایسه گردید. دستیابی به این سلول‌ها می‌تواند نقش مهمی در مطالعات بعدی در یافتن ارتباط بیان مداوم COX-2 با بروز فنوتیپ مقاومت چند دارویی از طریق ترانسپورتر ABCG2 داشته باشد.

مواد و روش‌ها

معرف‌ها و آنتی‌بادی‌ها

پلاسمید pSG5-COX-2 (توسط دکتر کلالی نیا، پژوهشگر بوعلی، مشهد، ایران)، معرف فیوژن ۶ از شرکت Roche، معرف برادفورد از شرکت تیتراکم با شماره کاتالوگ ۶۰۱۶۳۹، آنتی‌بادی برای COX-2 انسانی از شرکت Cayman Chemical، آنتی‌بادی بتا اکتین از شرکت SigmaAldrich و آنتی‌بادی پلی کلونال کونژوگه با آنزیم HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه از شرکت Abcam خریداری شد. سرم جنین گاوی (FBS)، پنی سیلین_ استرپتومایسین، تریپسین و RPMI ۱۶۴۰ با L- گلوتامین به ترتیب از شرکت Gibco و Biosera تهیه شدند. جنتیسین از شرکت Roche، متوکسیانترون هیدروکلراید و آمپی سیلین از شرکت Sigma Aldrich خریداری شدند.

ترانسفورماسیون

سلول‌های باکتری اشرشیا کولی (E. coli) (سویه DH5 α) از شرکت سینازن روی محیط Luria-Bertani (LB) حاوی آگار کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس یک کلونی مجزا در ۱ ml محیط کشت LB مایع در دمای ۳۷°C در دور ۲۰۰ rpm در طول شب در انکوباتور شیکردار قرار داده شد تا رشد کند ۱۰۰ ml از DH5 α که در طول شب رشد کرده بود، در ۱۵ ml محیط کشت LB تلقیح شد. سلول‌ها در دمای ۳۷°C با

۸۰۰۰ برداشت شدند. پلاسمید طبق دستورالعمل مربوط به Isolation Kit Plasmid DNA (از شرکت Genet Bio؛ شماره کاتالوگ K-۱۰۰۰) استخراج، خالص سازی و در دمای 20°C -نگهداری شد.

کشت سلول سرطانی انسان

رده سلولی سرطان سینه انسان MCF7 و مشتق مقاوم به میتوکسانترون آن MCF7/MX که ABCG2 را به میزان زیادی بیان می کند (هدیه شده توسط دکتر Erasmus Schneider از مرکز Wadsworth، دپارتمان سلامت نیویورک، USA) در محیط RPMI ۱۶۴۰ با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)، پنی سیلین (۵۰۰۰۰ unit/L) و استرپتومايسين (۵۰ mg/L) در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول های MCF7/MX در محیط حاوی میتوکسانترون با غلظت 10^{-7}M کشت شدند تا فوتیپ مقاوم به دارو را حفظ کنند.

ترانسفکشن پلاسمید pSG5-COX-2

در این قسمت پلاسمید pSG5-COX-2 خالص سازی شده از مرحله قبل طی فرایند لیپوفکشن توسط معرف فیوژن ۶ به سلول های سرطانی انسان طبق دستورالعمل مربوط به معرف فیوژن ۶ انتقال یافت. به طور خلاصه، سلول ها به میزان 10^5 سلول در ۳ حفره از پلیت ۶ خانه و 2×10^5 سلول در ۳ حفره دیگر آن کاشته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C و در حضور CO_2 انکوبه شدند. در روز ترانسفکشن، در یک میکروتیوپ مقدار کافی از محیط کشت فاقد سرم به عنوان رقیق کننده معرف ترانسفکشن فیوژن ۶ اضافه شد تا حجم کلی به $100\mu\text{l}$ برسد. معرف فیوژن ۶ مستقیماً به این محیط کشت اضافه شد. 2mg -۱ محلول DNA به معرف فیوژن ۶ رقیق شده اضافه شد (جدول شماره ۱).

دور 250rpm به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار قرار گرفتند تا باکتری ها به فاز لگاریتمی رشد برسند. سلول های E. coli که در محیط LB کشت داده شدند، بعد از رسیدن به دانسیته سلولی مناسب با سانتریفیوژ در دمای 4°C به مدت ۱۰ دقیقه با دور 6000rpm برداشت شدند (سلول ها در ادامه کار سرد باقی ماندند). رسوب سلولی در محلول 1M CaCl_2 سرد، مجدداً سوسپانسیون شد. سلول ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. سپس مجدداً در دمای 4°C سانتریفیوژ و در محلول 1M CaCl_2 سرد حاوی گلیسرول (v/v) ۱۵ درصد مجدداً سوسپانسیون شدند. در آخر به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. در این مرحله بخشی از سلول های مستعد در تعدادی میکروتیوپ تقسیم بندی و جهت نگهداری طولانی مدت، ابتدا به مدت ۲۴ ساعت به فریزر 20°C - و سپس به 70°C - منتقل شدن $2\mu\text{l}$ از DNA پلاسمیدی حاوی توالی COX-2 به میکروتیوپ حاوی سلول های مستعد اضافه شد. سلول ها ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. به سلول ها به مدت ۶۰ ثانیه در دمای 39°C شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ منتقل شدند. سلول ها ۱ ساعت در دمای 37°C در انکوباتور شیکر دار قرار گرفتند تا ژن مقاومت آنتی بیوتیکی پلاسمید قبل از قرار گرفتن در محیط انتخابی به طور کامل بیان شود. سوسپانسیون سلولی حاصل روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین ریخته و با پیپت پاستور خمیده یکنواخت شد. پلیت سلولی در دمای 37°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. یک کلونی مجزا از کلونی های حاوی پلاسمید در 5ml محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین ($100\mu\text{g/ml}$) تلقیح و به مدت ۸ ساعت در دمای 37°C با دور 300rpm انکوبه شد. 20ml از سوسپانسیون در 10ml از محیط کشت LB تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C با دور 200rpm انکوبه شد. سلول ها طی سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه و در دمای اتاق با دور rpm

جدول شماره ۱: نسبت‌هایی که برای سلول‌های چسبیده بهینه

غلظت DNA (µg)	حجم معرف فیوژن ۶ (µl)	نسبت های معرف فیوژن ۶ به DNA
۲	۳	۳:۲
۱	۳	۳:۱
۱	۶	۶:۱

شده‌اند

تریپسینه شدن سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط فاقد جنتیسین قرار گرفتند و پس از آن به محیط جنتیسین افزوده شد.

استخراج و تعیین غلظت پروتئین کل از سلول‌های ترانسفکت شده

سلول‌های ترانسفکت شده MCF7/MX و MCF7 که در محیط حاوی جنتیسین رشد کردند پس از رسیدن به غلظت سلولی ۹۰-۸۰ درصد، تریپسینه شدند و $10^6 \times 3$ سلول به یک میکروتیوپ انتقال داده شد. بافر لیزکننده سرد NP-۴۰ به آن اضافه گردید. لیزات توسط سونیکاتور پروب دار (Bandelin, uw mini20) طی سه سیکل ۲ ثانیه‌ای با قدرت ۲۰ درصد و با ۲ دقیقه فاصله بین هر سیکل سونیکیت شد و در نهایت در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در 4°C سانتریفوژ گردید. محلول رویی با احتیاط برداشته و در دمای 20°C -نگهداری شد. برای تعیین غلظت پروتئین کل در محلول، از معرف برادفورد استفاده شد. میزان جذب متناسب با میزان پروتئین در محلول است. جذب در 550 nm ثبت شد و غلظت پروتئین در مقایسه با منحنی استاندارد تعیین شد.

وسترن بلائینگ

برای مقایسه میزان بیان پروتئین COX-2 بین سلول‌های مختلف از روش وسترن بلائینگ استفاده شد. در ابتدا میزان ۶۰ mg پروتئین توسط ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد جداسازی شد. سپس پروتئین به غشاء PVDF (Polyvinylidenedifluoride) (Millipore, Germany) انتقال پیدا کرد و غشاء در محلول بلوک کننده (BSA ۲٪، PBS1x) در دمای 4°C و در طول شب همراه با تکان مداوم قرار گرفت. غشاء با آنتی‌بادی اولیه منوکلونال ضد COX-2 انسانی (۱:۲۵۰) در طی شب در دمای 4°C و همراه با تکان مداوم انکوبه شد. در آخر نیز غشاء به مدت ۲ ساعت در دمای 25°C در آنتی‌بادی

به میکروتیوپ به آرامی ضربه زده شد تا محتویات مخلوط شود. محیط رویی سلول‌های درون پلیت برداشته و محیط کشت فاقد سرم افزوده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، کمپلکس معرف فیوژن ۶/DNA به سلول‌ها اضافه و اطراف حفره به طور یکنواخت پخش شد و پلیت‌ها مجدداً به مدت ۴ ساعت در دمای 37°C و در شرایط ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سپس $900\mu\text{l}$ محیط کشت حاوی ۲۰ درصد FBS به هر حفره اضافه شد. پلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C و در شرایط ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. پس از انکوباسیون محیط رویی، سلول‌ها با محیط سرم دار حاوی جنتیسین ($G418$) با غلظت $500\mu\text{g/ml}$ تعویض شد تا سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت کردند در محیط انتخاب شوند (ژن مقاومت به جنتیسین مارکر انتخاب است). پس از آن که سلول‌ها سطح حفره را پر کردند، تریپسینه شده و هر حفره به یک فلاسک T ۲۵ مجزا انتقال داده شد. به سلول‌های درون فلاسک، محیط سرم دار فاقد جنتیسین اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط حاوی جنتیسین جایگزین محیط قبلی شد. سلول‌ها به مدت ۱ ماه با این روش در محیط حاوی جنتیسین تیمار شدند تا بیان مداوم COX-2 در آن‌ها القاء شود. برای نگهداری طولانی مدت، سلول‌ها در محیط فریز کننده حاوی 10 (v/v) DMSO درصد فریز شدند. سلول‌ها پس از پاساژ، در دو شرایط مختلف از لحاظ محیط کشت قرار گرفتند. در حالت اول به سلول‌ها پس از تریپسینه شدن، بلافاصله محیط حاوی جنتیسین افزوده شد و در حالت دوم پس از

ثانویه پلی کلونال کونژوگه با HRP (۱:۱۰۰۰۰) همراه با تکان مداوم قرار گرفت. لکه‌ها توسط کیت شناسایی کمی لومینسانس (از شرکت پارس توس) با استفاده از دستگاه uv doc روی غشاء قابل رویت گردید. باندهای شناسایی شده با استفاده از نرم افزار ImageJ2X آنالیز و دانسیته نسبی پروتئین COX-2 محاسبه شد. کنترل مثبت در این جا سلول MCF7 والد و MCF7/MX والد است. Loading control. که قسمت کلیدی مطالعات مقایسه ای سطح بیان پروتئین‌ها در نمونه‌های مختلف است، بتا اکتین در نظر گرفته شد.

بررسی آماری

دانسیته نسبی پروتئین COX-2 توسط برنامه ImageJ2X آنالیز شد. بررسی‌های آماری در نرم افزار SPSS با استفاده از تست‌های آماری ANOVA همراه با Tukey's post-hoc انجام گرفت.

یافته‌ها

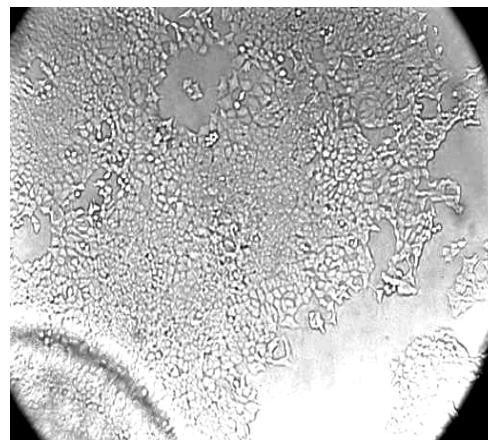
پلاسمید خالص سازی شده طی فرآیند ترانسفکشن به سلول‌های سرطان سینه MCF7 و MCF7/MX انتقال داده شد. بسته به نسبت معرف فیوژن ۶ / DNA، سه نوع سلول تهیه شد (جدول شماره ۱). سلول‌های ترانسفکت شده، ۴۸ ساعت در محیط فاقد جنتیسین قرار گرفتند تا

به پلاسمید فرصت داده شود ژن مقاومت به جنتیسین را بیان کند. سپس محیط رویی سلول‌ها با محیط حاوی جنتیسین تعویض شد. نتایج نشان داد که سلول‌هایی که پلاسمید را طی فرآیند ترانسفکشن دریافت کرده‌اند، در مجاورت جنتیسین زنده مانده و نسبت معرف فیوژن ۶ / DNA بین سه نوع سلول حاصل در قدرت بقاء تفاوت آشکاری ایجاد نکرده است (شکل شماره ۱ و ۲).

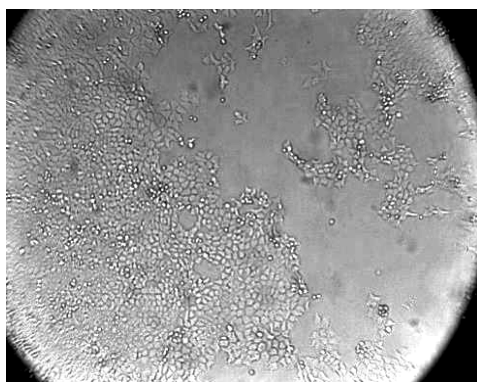
در آن دسته از سلول‌هایی که بلافاصله پس از پاساژ، محیط حاوی جنتیسین به آن‌ها افزوده شد، بعد از ۲۴ ساعت تعداد کمی سلول باقی ماندند. سلول‌های باقی مانده مقاومت بالایی در حضور جنتیسین داشتند که نشان می‌دهد پلاسمید را به میزان بالایی دریافت کرده‌اند و ژن مقاومت به جنتیسین در آن‌ها در سطح بالایی بیان می‌شود. اما محیط بعد از ۴۸ ساعت با محیط فاقد جنتیسین تعویض شد، زیرا سلول‌ها نتوانستند به دلیل تعداد کم در محیط دوام بیاورند و به تدریج ضعیف شده و از بین رفتند. پس از آن که سلول‌ها در محیط فاقد جنتیسین به غلظت سلولی ۴۰-۳۰ درصد رسیدند، مجدداً محیط حاوی جنتیسین به آن‌ها اضافه شد. هم‌چنین در آن دسته از سلول‌هایی که ۲۴ ساعت بعد از پاساژ محیط حاوی جنتیسین به آن‌ها افزوده شد، در مقایسه با گروه قبلی، تعداد بیش تری سلول باقی ماند.



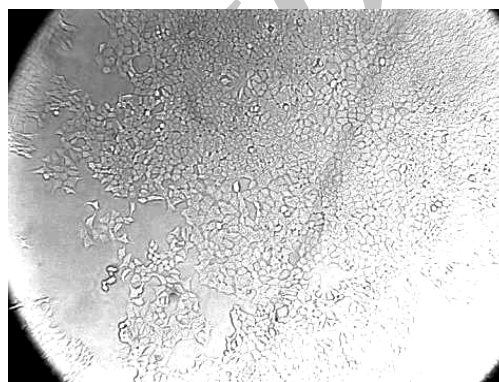
۳:۱MCF7



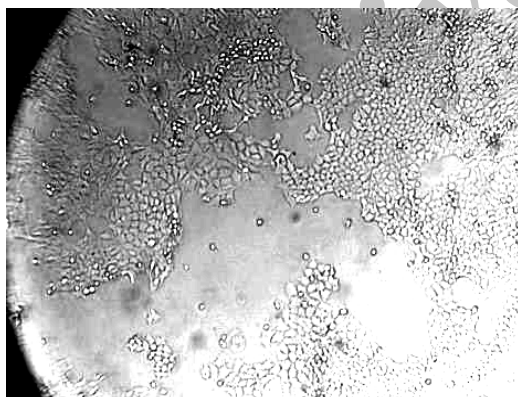
۳:۱MCF7



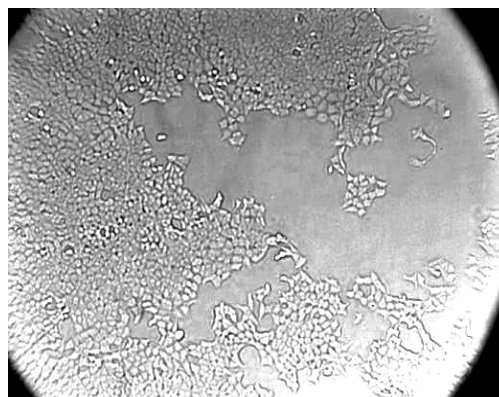
۳:۲MCF7



۳:۲MCF7



۶:۱MCF7

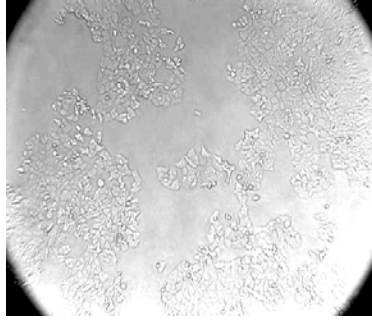


۶:۱MCF7

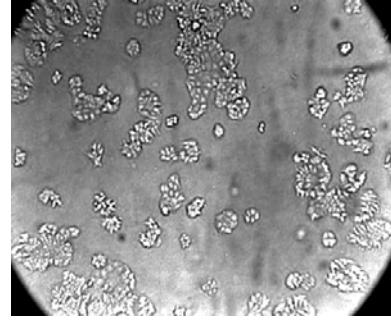
(ب) سلول‌ها بعد از افزودن جنتیسین

(الف) سلول‌ها قبل از افزودن جنتیسین

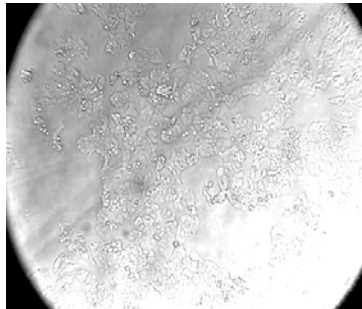
شکل شماره ۱: سلول‌های MCF7 بعد از افزودن کمپلکس معرف فیوژن ۶/ DNA (بزرگنمایی $\times 40$) (الف) سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت در محیط فاقد جنتیسین (ب) سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از افزودن محیط حاوی جنتیسین، سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت نکردند، در مجاورت با جنتیسین از بین رفتند، اما سلول‌هایی که حاوی پلاسمید pSG5-COX-2 بودند، به دلیل وجود ژن مقاومت به جنتیسین در داخل پلاسمید، در مجاورت با جنتیسین زنده ماندند (۳:۱، ۳:۲، و ۶:۱ نسبت معرف فیوژن به DNA است).



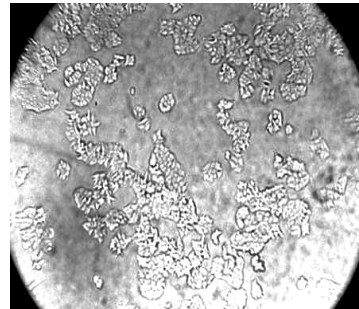
۳:۱ MCF7/MX



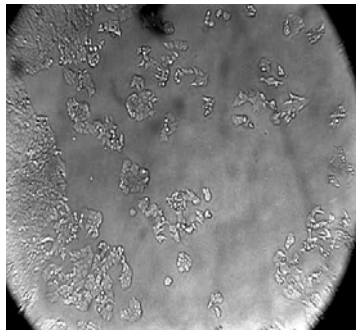
۳:۱ MCF7/MX



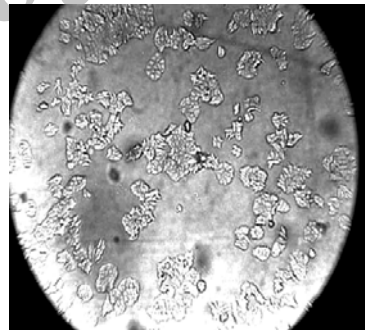
۳:۲ MCF7/MX



۳:۲ MCF7/MX



۶:۱ MCF7/MX



۶:۱ MCF7/MX

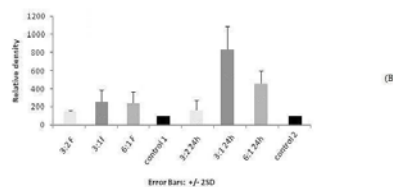
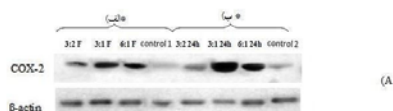
(ب) سلول‌ها بعد از افزودن جنتیسین

(الف) سلول‌ها قبل از افزودن جنتیسین

شکل شماره ۲: سلول‌های MCF7/MX بعد از افزودن کمپلکس معرف فیوژن ۶ / DNA (بزرگ‌نمایی X40) (الف) سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت در محیط فاقد جنتیسین، (ب) سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از افزودن محیط حاوی جنتیسین، سلول‌هایی که پلاسمید را دریافت نکردند، در مجاورت با جنتیسین از بین رفتند، اما سلول‌هایی که حاوی پلاسمید 2-COX-pSG5 بودند، به دلیل وجود ژن مقاومت به جنتیسین در داخل پلاسمید، در مجاورت با جنتیسین زنده ماندند (۱:۳، ۲:۳ و ۱:۶ نسبت معرف فیوژن ۶ به DNA است).

جنتیسین قرار گرفتند، ضعیف شده، پس از رسیدن به غلظت سلولی ۷۰-۶۰ درصد، دیواره‌های خود را از

سلول‌های MCF7/MX سلول‌های حساس‌تری هستند. این سلول‌ها بعد از سه روز که در محیط حاوی



شکل شماره ۳: مقایسه میزان بیان پروتئین COX-2 در سلول‌های MCF7 با روش وسترن بلائینگ. لیزات سلولی از سلول‌هایی گرفته شده که توسط پلاسمید pSG5-COX-2 با نسبت‌های مختلف از معرف فیوژن ۶ به DNA ترانسفکت شده‌اند. (A) باندهای اختصاصی پروتئین COX-2 و باندهای پروتئین بتا اکتین (C) داده‌ها حاصل آنالیز دانسیتومتری باندها با نرم افزار ImageJ2X می‌باشد، (n=۳) * P<0.05 در مقایسه با گروه کنترل است. *الف) سلول‌هایی که بلافاصله بعد از تریپسین کردن محیط حاوی جنتیسین به آن‌ها اضافه شد (۳:۱F، ۶:۱F، ۳:۲F) * ب) سلول‌هایی که بعد از ۲۴ ساعت محیط حاوی جنتیسین به آن‌ها افزوده شد (۳:۱ ۲۴ h، ۶:۱ ۲۴ h، ۳:۲ ۲۴ h).

بررسی میزان بیان پروتئین COX-2 در سلول‌های

ترانسفکت شده MCF7/MX

سلول‌های ترانسفکت شده MCF7/MX از لحاظ میزان بیان پروتئین COX-2 توسط وسترن بلائینگ مورد بررسی قرار گرفتند (شکل شماره ۴). داده‌ها وجود اختلاف معنی‌دار (P<0.05) بین سلول‌های MCF7/MX ۳:۲ در مقایسه با کنترل را نشان دادند، این اختلاف در جهت افزایش میزان بیان COX-2 در سلول ترانسفکت شده MCF7/MX ۳:۲ می‌باشد.

دست داده و به تدریج از بین رفتند. در این سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت، محیط کشت با محیط فاقد جنتیسین تعویض شد.

بررسی میزان بیان پروتئین COX-2 در سلول‌های

ترانسفکت شده MCF7

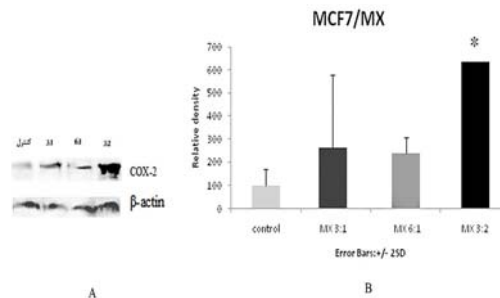
میزان بیان پروتئین COX-2 در سلول‌های ترانسفکت شده MCF7 توسط وسترن بلائینگ مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۳). نتایج نشان داد که سلول MCF7 با نسبت معرف فیوژن ۶ به DNA ۳:۱ در گروه ۲ که جنتیسین بعد از ۲۴ ساعت به محیط اضافه شد، نسبت به کنترل (سلول والد MCF7) افزایش معنی‌داری در جهت افزایش بیان پروتئین COX-2 داشت. مقایسه نتایج بین دو گروه ۱ و ۲ نیز در این سلول‌ها نشان داد که سلول MCF7 با نسبت ۳:۱ مربوط به گروه ۱ یعنی در حالتی که جنتیسین بلافاصله پس از پاساژ به محیط اضافه می‌شود، در مقایسه با سلول MCF7 با نسبت ۳:۱ مربوط به گروه ۲ یعنی در حالتی که جنتیسین بعد از ۲۴ ساعت به محیط اضافه می‌شود، اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تفاوت افزایش بیان پروتئین COX-2 به میزان ۷۰ درصد (۳ برابر) در سلول MCF7 ۳:۱ گروه ۲ را نشان می‌دهد (P<0.05)

شامل تهاجم توموری، رگ‌زایی و متاستاز را تسهیل نماید (۱۷، ۱۴).

در طی دهه گذشته، مطالعات زیادی گزارش شدند که بیان اعمال شده COX-2 منجر به افزایش بیان پروتئین‌های مقاومت دارویی در رده‌های سلولی سرطانی متفاوت می‌شود (۲۳، ۱۸).

در مطالعه‌ای که توسط کلالی‌نیا و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام گرفت، ارتباط بین بیان COX-2 و گسترش فنوتیپ مقاوم به دارو در بیماران مبتلا به سرطان بررسی شد. هدف از این مطالعه، بررسی نقش COX-2 در تنظیم انتشار دارو توسط ABCG2 در یک گروه از رده‌های سلولی سرطان پستان از جمله MCF-7 بود. نتایج یک ارتباط سببی احتمالی بین COX-2 و فعالیت ABCG2 را نشان می‌دهد (۲۴). در مطالعه دیگری که توسط این گروه در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت، ارتباط مثبت بین COX-2 و بیان ژن ABCG2 را با استفاده از القاء کننده یعنی ۱۲-O-تترادکانویل فوربول-۱۳-استات (TPA) در رده‌های سلولی سرطان پستان انسان بررسی شد که نتایج نشان داد بیان COX-2 را در سلول‌های MDA-MB-231 تحریک می‌کند در حالی که سبب القاء اندکی در بیان COX-2 در رده‌های سلولی MCF7/MX و MCF7 می‌شود. هم‌چنین TPA سبب افزایش بیان ABCG2 در سلول‌های MCF7 مقاوم به دارو و حساس به دارو می‌شود، در حالی که در سلول‌های MDA-MB-231 بیان ABCG2 کاهش می‌یابد. این نتایج نشان دادند که جهت مشخص بودن دقیق نوع ارتباط بیان COX-2 با ABCG2، القای بیان ژن باید به صورت اختصاصی انجام شود. در این مطالعه نویسندگان به دنبال ایجاد سلول‌هایی بودند که به طور اختصاصی بیان بالای COX-2 داشته باشند تا در مطالعات بعدی از آن استفاده شود (۲۵).

در مطالعه حاضر که بر روی سلول‌های MCF7 و MCF7/MX انجام گرفته است، ژن COX-2 توسط وکتور بیانی pSG5 و طی فرایند ترانسفکشن به



شکل شماره ۴: مقایسه میزان بیان پروتئین COX-2 در سلول‌های MCF7/MX با روش وسترن بلائینگ. لیزات سلولی از سلول‌هایی گرفته شده که توسط پلاسمید pSG5-COX-2 با نسبت‌های مختلف از معرف فیوژن ۶ به DNA ترانسفکت شده‌اند. (A) باندهای اختصاصی پروتئین COX-2 و بتا اکتین (B) داده‌ها حاصل آنالیز دانسیتومتری باندها با نرم افزار ImageJ2X می‌باشد، (n=۳)، مقادیر در نمودار میانگین ± (انحراف معیار) را نشان می‌دهند. * P<0.05، اختلاف معنی‌دار با کنترل با استفاده از تست ANOVA، Tukey's post hoc را نشان می‌دهد.

بحث

مقاومت دارویی می‌تواند یکی از عمده دلایل شکست فرآیند شیمی‌درمانی در سرطان‌های انسانی باشد. مقاومت دارویی پدیده‌ای است که در آن سلول‌های سرطانی که در معرض یک داروی ضد سرطان قرار گرفته‌اند، به داروهای ضد سرطانی دیگر که ساختار و عملکرد متفاوتی با داروی ضد سرطان اولیه دارند، مقاومت نشان می‌دهند. مقاومت دارویی کلاسیک عمدتاً به علت افزایش پمپ‌های انتشار در غشای سلولی سلول‌های پمپ‌کننده داروهای ضد سرطان به خارج از سلول ایجاد می‌شود (۱۳، ۱). سیکلواکسیژنازها آنزیم‌های کلیدی هستند که تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین‌ها و سایر ایکوزانوئیدها را کاتالیز می‌کنند. COX-2 عمدتاً در سلول‌های التهابی بیان می‌شود و در سنتز پروستاگلاندین‌ها به واسطه فرایندهای پاتولوژیک مثل درد، التهاب، تب و کارسینوژنز دخالت دارد. بیان COX-2 ممکن است چندین فرایند انکوژنیک

فرآیند ترانسفکشن پلاسמיד pSG5-COX-2 به این سلول‌ها افزایش شدیدی نشان داد که منجر به افزایش متاستاز در این سلول‌ها شد (۲۷).

به طور کل، نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد که ترانسفکت پلاسמיד حاوی COX-2 در رده سلولی MCF7 بسته به شرایط و نسبت DNA به معرف فیوژن ۶ متفاوت می‌باشد. در شرایطی که محیط حاوی جنتیسین ۲۴ ساعت بعد از پاساژ به سلول اضافه می‌شود، افزایش بیان قابل توجهی را مشاهده کردیم، در حالی که در حالت دیگر (که بلافاصله جنتیسین اضافه می‌گردد)، افزایش کم‌تری دیده می‌شود. تاثیر عامل دیگر یعنی نسبت DNA به معرف فیوژن ۶ نیز در بیان COX-2 مشخص کرد که در حالتی که نسبت DNA: معرف فیوژن ۶ (۶:۱) است، بهترین کارایی ترانسفکشن را در سلول‌های MCF7 داریم. اما در سلول‌های MCF7/MX در گروه ۳:۲ افزایش بیان مشخص است. در حقیقت سطح بیان ژن مورد نظر بسته به رده سلولی و شرایط کشت متفاوت است و افزایش میزان DNA لزوماً منجر به افزایش کارایی ترانسفکشن نمی‌شود. در واقع بیان COX-2 تحت تاثیر چند فاکتور و شرایط مختلف قرار می‌گیرد.

سپاسگزاری

از اساتید گرامی خانم دکتر فاطمه کالالی نیا و خانم دکتر زهرا نور محمدی برای راهنمایی و همکاری شان سپاسگزارم.

References

1. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* 2005; 5: 1-13.
2. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Németh K, Váradi A. ABCG2 a transporter for all seasons. *FEBS Lett* 2004; 567: 116-120.
3. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in

سلول‌های فوق انتقال داده شد تا تاثیر آن بر بیان پروتئین COX-2 در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور میزان پروتئین COX-2 در این سلول‌ها با استفاده از روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از باندهای وسترن بلات در سلول‌های MCF7 نشان داد که تنها سلول MCF7 که نسبت DNA به معرف فیوژن در آن ۳:۱ بود و ۲۴ ساعت بعد از تریپسین کردن محیط حاوی جنتیسین به آن افزوده شد، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان می‌دهد ($P < 0.05$). بررسی داده‌های حاصل از وسترن بلات سلول‌های MCF7/MX نیز اختلاف معنی‌داری بین سلول MCF7/MX ۳:۲ در مقایسه با سلول والد کنترل نشان داد ($P < 0.05$). اختلاف در جهت افزایش بیان پروتئین COX-2 در مقایسه با سلول ترانسفکت نشده است. اما در سایر سلول‌های MCF7/MX، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

Lin و همکارانش در سال ۲۰۰۱، وکتور بیانی بنیادی COX-2 را به یک رده سلولی آدنوکارسینومای ریه انسان ترانسفکت کردند و چندین کلون به دست آوردند که COX-2 را به طور دائم بیان می‌کردند. این کلون‌های دارای بیان بالای COX-2 به آپوپتوز القاء شده توسط اشعه UVB، وینبلاستین (VBL) یا سایر داروهای ضد سرطان مقاومت آشکاری نشان دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که COX-2 بقاء سلول را توسط افزایش سطح Mcl-1 با فعال‌سازی مسیر وابسته به PI3K/Akt پیش می‌برد (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Singh و همکارانش در سال ۲۰۰۵ صورت گرفت، بیان COX-2 در سلول‌های MDA-435S طی

- drug transport. *AAPS J* .2005; 7 (1): 118-133.
4. Doyle L, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22(47): 7340-7358.
 5. Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol* .2002; 198(2): 213-219.
 6. Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* 2000; 96(1): 365-368.
 7. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; 62: 167-215.
 8. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* .1998. 12(12): 1063-1073.
 9. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* .2002; 190(3): 279-286.
 10. Ratnasinghe D, Daschner PJ, Anver MR, Kasprzak BH, Taylor PR, Yeh GC, et al. Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res*. 2001; 21(3c): 2141-2147.
 11. Fantappie O, Masini E, Sardi I, Raimondi L, Bani D, Solazzo M, et al. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* 2002; 35(4): 843-852.
 12. Puhlmann U, Ziemann C, Ruedell G, Vorwerk H, Schaefer D, Langebrake C, et al. Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells. *J Pharmacol Exp Ther* .2005; 312(1): 346-354.
 13. Ejendal KF, Hrycyna CA. Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3(5): 503-511.
 14. Hofer M, Pospíšil M, Hoferová Z, Weiterová L, Komůrková D. Stimulatory action of cyclooxygenase inhibitors on hematopoiesis: a review. *Molecules* 2012; 17(5): 5615-5625.
 15. Kang HK, Lee E, Pyo H, Lim SJ. Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(9): 1358-1363.
 16. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int J Cell Bio* .2010; 2010.
 17. Gajraj NM. Cyclooxygenase-2 inhibitors. *Anesth Analg* 2003; 96(6): 1720-1738.
 18. Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein)

- by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002; 277(41): 38915-38920.
19. Sorokin A. Cyclooxygenase-2: potential role in regulation of drug efflux and multidrug resistance phenotype. *Curr Pharm Des* 2004; 10(6): 647-657.
 20. Surowiak P, Materna V, Denkert C, Kaplenko I, Spaczyński M, Dietel M, et al. Significance of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein coexpression in ovarian cancers. *Cancer Letters* 2006; 235(2): 272-280.
 21. Surowiak P, Materna V, Matkowski R, Szczuraszek K, Kornafel J, Wojnar A, et al. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(5): R862-R870.
 22. Surowiak P, Pawelczyk K, Maciejczyk A, Pudelko M, Kołodziej J, Zabel M, et al. Positive correlation between cyclooxygenase 2 and the expression of ABC transporters in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2008; 28(5B): 2967-2974.
 23. Lee JY, Tanabe S, Shimohira H, Kobayashi Y, Oomachi T, Azuma S, et al. Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Res Vet Sci* 2007; 83(2): 210-216.
 24. Kalalinia F, Elahian F, Behravan J. Potential role of cyclooxygenase-2 on the regulation of the drug efflux transporter ABCG2 in breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* .2011; 137(2): 321-330.
 25. Kalalinia F, Elahian F, Hassani M, Kasaeian J, Behravan J. Phorbol ester TPA modulates chemoresistance in the drug sensitive breast cancer cell line MCF-7 by inducing expression of drug efflux transporter ABCG2. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(6): 2979-2984.
 26. Lin MT, Lee RC, Yang PC, Ho FM, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(52): 48997-49002.
 27. Singh B, Berry JA, Shoher A, Ayers GD, Wei C, Lucci A. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene* 2007; 26(26): 3789-3796.