

## Apoptosis Induction in Glioma Cells by Downregulation of HIF-1 $\alpha$ Gene

Mohebbi S.<sup>1</sup> *PhD*, Behmanesh M.\* *PhD*, Nikkhah M.<sup>1</sup> *PhD*, Tohidi Moghadam T.<sup>1</sup> *PhD*

\*Genetic & Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Nanobiotechnology Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Abstract

**Aims:** HIF-1 transcription factor is a key determinant of oxygen-dependent gene regulation, which its role has been demonstrated for the survival and progress of cancer tumors. The effect of suppression of HIF-1 $\alpha$  on the evaluation of HIF-1 dependent processes and interference with pathophysiological events caused by hypoxia is important. The aim of this study was the apoptosis induction in glioma cells by downregulation of Hif-1 $\alpha$  gene.

**Materials & Methods:** In this experimental study, a specific siRNA against the HIF1 $\alpha$  gene was developed using OligoWalk and Mit (siRNA.wi.mit.edu) servers and the online design department of Invivogene and Qiagen companies and the efficacy of its silencing in the U87 glioma cell line was quantitatively investigated by the Real-time PCR technique. In order to find out the effect of reduction of expression in the process of cell cycle and apoptosis, staining with PI and Annexin-PI was performed and the number of cells in each phase and the rate of cell mortality with control were compared by flow cytometry.

**Findings:** The designed HIF-1 $\alpha$ -siRNA was able to reduce HIF1 $\alpha$  expression by 40%. The treatment of U87 cells after 24 hours increased the cells by 6% and after 48 hours, increased them by 12% in the sub G1 stage. Confirming the cell cycle changes, 48-hour treatment induced apoptosis in 58% of cells; regarding the 1.5% rate of apoptosis in the control cells, this cell death rate was very significant and showed the ability of the designed siRNA to induce apoptosis.

**Conclusion:** The apoptosis induction of specific siRNA designed against HIF1 $\alpha$  gene has a significant effect on the reduction of HIF-1 $\alpha$  gene expression, cell growth, and apoptosis.

### Keywords

HIF1 $\alpha$  [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/67527134>];  
siRNA [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68034741>];  
Cell Cycle [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68002453>];  
Apoptosis [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68017209>]

---

\*Corresponding Author

Tel: +98 (21) 82884451

Fax: +98 (21) 82884717

Post Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran

behmanesh@modares.ac.ir

Received: May 16, 2016

Accepted: February 5, 2017

ePublished: March 20, 2018

## القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما به‌وسیله مهار ژن HIF-1 $\alpha$

سهامه محبی PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مهرداد بهمنش \* PhD

گروه ژنتیک و نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مریم نیکخواه PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

طاهره توحیدی‌مقدم PhD

گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** فاکتور رونویسی HIF-1، یک عامل تعیین‌کننده کلیدی در تنظیم ژن وابسته به اکسیژن است که نقش آن برای بقا و پیشرفت تومورهای سرطانی به اثبات رسیده است. بررسی تاثیر سرکوب HIF-1 $\alpha$  برای بررسی فرآیندهای وابسته به HIF-1 و تداخل با حوادث پاتوفیزیولوژیک ناشی از هیپوکسی اهمیت دارد. هدف پژوهش حاضر القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما به‌وسیله مهار ژن HIF-1 $\alpha$  بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، siRNA اختصاصی علیه ژن HIF1 $\alpha$  از سرورهای OligoWalk و Mit (siRNA.wi.mit.edu) و بخش طراحی آنالین شرکت‌های Qiagen و Invivogene طراحی شد و کارایی خاموش‌سازی آن در رده سلولی گلیوما U87 به‌وسیله تکنیک ریل‌تایم پی‌سی‌آر به‌صورت کمی مورد بررسی قرار گرفت. برای پی‌بردن به تاثیر کاهش بیان در روند چرخه سلولی و آپوپتوز، رنگ‌آمیزی با PI و انکسین-PI انجام و با تکنیک فلوسایتومتری، تعداد سلول‌ها در هر فاز و میزان مرگ‌ومیر سلولی با کنترل مقایسه شد.

**یافته‌ها:** siRNA اختصاصی طراحی‌شده برای ژن HIF1 $\alpha$  قادر به کاهش بیان ژن به میزان ۴۰٪ بود. تیمار سلول‌های U87 پس از ۲۴ ساعت سبب افزایش ۶٪ سلول‌ها و پس از ۴۸ ساعت، سبب ۱۲٪ افزایش سلول‌ها در مرحله sub G1 شد. در تایید تغییرات چرخه سلولی، تیمار ۴۸ ساعته، سبب القای آپوپتوز در ۵۸٪ سلول‌ها شد که با توجه به میزان ۱/۵ درصدی آپوپتوز در سلول‌های کنترل، این مقدار مرگ سلولی بسیار چشمگیر بود و توانایی siRNA طراحی‌شده را در القای آپوپتوز نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** القای آپوپتوز با siRNA اختصاصی طراحی‌شده علیه ژن HIF1 $\alpha$  بر کاهش بیان ژن HIF-1 $\alpha$ ، روند رشد سلول‌ها و افزایش آپوپتوز تاثیر قابل ملاحظه‌ای دارد.

**کلیدواژه‌ها:** HIF1 $\alpha$ ، RNA مداخله‌گر، siRNA، چرخه سلولی، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۷

\* نویسنده مسئول: behmanesh@modares.ac.ir

### مقدمه

به‌واسطه اختلال در اطلاعات ژنتیکی یا عوامل جهش‌زا مانند مواد رادیواکتیو، مواد شیمیایی و سمی یا تابش بیش از حد اشعه‌های یونیزان، یک سلول طبیعی ممکن است به سلول سرطانی تبدیل شود<sup>[۱]</sup>. وقتی DNA یک سلول تغییر می‌کند، آن سلول با سلول‌های سالم کنار خود تفاوت می‌یابد و دیگر کار سلول‌های طبیعی بدن را انجام نمی‌دهد. این سلول تغییر یافته از سلول‌های همسایه‌اش جدا می‌شود و روند تکثیر مداومی را طی می‌کند. به عبارت دیگر، سلول تغییر یافته از دستورها و علائم داخلی که سلول‌های دیگر در کنترل آنها هستند، پیروی نمی‌کند و به‌جای هماهنگی با سلول‌های دیگر، خودسرانه عمل می‌کند. وقتی سلول

"جهش‌یافته" تقسیم می‌شود، به دو سلول جدید "جهش‌یافته" تبدیل می‌شود تا زمانی که همان یک سلول به توده‌ای از سلول‌ها که تومور نامیده می‌شود، تبدیل می‌شود<sup>[۲، ۳]</sup>. زمانی که حجم تومور به ۲ میلی‌متر مکعب می‌رسد، بار متابولیک افزایش‌یافته سلول‌ها، مانع از توزیع مناسب متابولیت‌ها و مواد مغذی برای رشد تومور می‌شود. در این زمان، حالت هیپوکسی سلولی شروع می‌شود که القاگر جوانه‌زنی رگ‌های خونی جدید از عروق موجود است<sup>[۴]</sup>. در نتیجه شکل‌گیری رگ‌های خونی، اکسیژن و مواد غذایی به سلول‌های تومور رسیده و سبب بقا و تکثیر آنها می‌شود. هیپوکسی، سبب پایدار شدن زیرواحد آلفای فاکتور رونویسی القا شده در زمان هیپوکسی (HIF1 $\alpha$ ) می‌شود، در حالی که وقتی اکسیژن کافی در دسترس سلول باشد، این زیرواحد توسط آنزیم پرولیل‌هیدروکسیلاز، هیدروکسیله شده<sup>[۵]</sup> و پس از اتصال به پروتئین فون‌هیپیل‌لیندو (VHL) توسط سیستم یوبی کوئیتین پروتئازوم (UPS) تجزیه می‌شود<sup>[۶]</sup>. اما در زمان هیپوکسی، این زیرواحد پس از دایمر شدن با زیرواحد  $\beta$  به‌عنوان فاکتور رونویسی وارد هسته شده و سبب افزایش رونویسی ژن‌های مربوط به پروتئین‌های پیش‌ساز رگ‌زایی مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF)، فاکتور نکروزدهنده تومور (TNF $\alpha$ ) آنزیم‌های مربوط به مسیر گلیکولیز و پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز به داخل سلول و آپوپتوز موارد می‌شود<sup>[۷، ۸]</sup>. HIF، پاسخ به هیپوکسی سلولی را حس کرده و تنظیم می‌کند. HIF یک پروتئین هتروداپمر متشکل از یکی از سه نوع زیرواحد  $\alpha$  و یک زیرواحد  $\beta$  است. زیرواحد HIF1 $\beta$  به‌طور دائم بیان می‌شود، در حالی که بیان HIF1- $\alpha$  تنها در زمانی که غلظت اکسیژن سلول به کمتر از ۶٪ می‌رسد، به‌وسیله هیپوکسی القا می‌شود.

HIF-1 $\alpha$ ، حفظ‌شده‌ترین عضو خانواده HIF از نظر تکاملی است. دو عضو دیگر از این خانواده بزرگ هلیکس-لوپ-هلیکس انتقال‌دهنده هسته‌ای (bHLH-PAS)، یکی HIF-2 $\alpha$  است که شبیه HIF1 $\alpha$  بوده، به‌وسیله هیپوکسی پایدار شده و به گیرنده آریل‌هیدروکربن انتقال‌دهنده هسته‌ای (ARNT) متصل می‌شود<sup>[۹]</sup> و عضو دیگر هم HIF-3 $\alpha$ <sup>[۱۱]</sup> است. HIF-1 $\alpha$  و HIF-2 $\alpha$  دارای ۴۸٪ تشابه در زنجیره آمینواسیدی و ساختار پروتئینی هستند. HIF-1 $\alpha$  فعال‌ترین ایزوفرم در دوره‌های زمانی کوتاه هیپوکسی (۰/۱۰٪ < ۲۴-۲ ساعت) در برخی از رده‌های سلولی است، در حالی که HIF-2 $\alpha$  در شرایط هیپوکسی فیزیولوژیک یا خفیف، فعال (۰/۲۵٪ <) است و بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت هم می‌تواند فعال باشد<sup>[۱۲]</sup>.

زیرواحد  $\alpha$  با شماره دستیابی NG\_029606 در بانک ژنی روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۱۴ (q23.21) قرار گرفته و دارای ۵۹۸۵۹ جفت نوکلئوتید است. ژن زیرواحد  $\beta$  به‌نام انتقال‌دهنده آریل‌هیدروکربن هسته‌ای (ARNT) هم شناخته می‌شود. آنالیزهای ایمنوهِیستوشیمی از بیوپسی‌های سرطان انسان نیز سطوح افزایش‌یافته‌ای از پروتئین‌های HIF1 را نسبت به بافت نرمال اطراف در اکثریت سرطان‌های متاستاتیک آشکار کرده است<sup>[۱۳]</sup>. همچنین، تومورهایی که دارای افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  هستند، از لحاظ فنوتیپ توموری به‌خصوص در سرطان‌های گردن و رحم، مهاجم به میزان بالایی رگ‌زا و مقاوم به درمان هستند. همچنین افزایش بیان این پروتئین در سرطان‌های پستان، ریه، پوست، کولون، رحم، معده، پروستات و کلیه نیز ثابت شده

طراحی siRNA از سرورهای OligoWalk و Mit (siRNA.wi.mit.edu) و بخش طراحی آنلاین شرکت‌های Invivogene و Qiagen استفاده شد و توالی مورد نظر به شرکت MWG (آلمان) سفارش داده شد (جدول ۱).

طراحی پرایمر: برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزارهای Gene Runner 6.5.58 Beta و Oligo 7 استفاده شد. پس از طراحی پرایمرها، جست‌وجو با نرم‌افزار Blast در ژنوم انسان انجام شد تا از یکتابودن محل جفت‌شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود. نتایج جست‌وجو در ژنوم نشان داد که همه پرایمرها دارای محل باندشدن منحصر به فردی هستند و به‌طور اختصاصی به ژن هدف متصل می‌شوند. از ژن بتا‌اکتین ( $\beta$ -Actin) نیز به‌عنوان ژن کنترل داخلی در بررسی بیان ژن استفاده شد (جدول ۱).

تیمار سلول‌ها: ۱۰<sup>۵</sup> سلول U87 در یک پلیت ۶ خانه به‌ازای هر چاهک کشت داده شد. برای انجام تیمار سلولی از ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و محیط Opti-MEM استفاده شد. از ۴۰ پیکومول siRNA برای ترانسفکشن سلول‌ها استفاده و ورود siRNA به داخل سلول‌ها به‌وسیله میکروسکوپی فلورسنت پس از ۱۲ ساعت بررسی شد.

استخراج RNA از سلول‌های U87 و سنتز cDNA (RT-PCR): برای لیزکردن سلول‌ها از محلول هموژن و پایدارکننده RNA، به‌نام RNXplus (سیناژن؛ ایران) و برای رسوب‌دادن RNA، از ایزوپروپانول استفاده شد. RNA رسوب‌داده شده با اتانول ۷۰٪ شست‌شو داده شد. در پایان، رسوب در آب دی‌اتیل‌پیروکربنات (DEPC) حل شد. میکروتیوب حاوی RNA تا زمان استفاده به فریز ۷۰°C- منتقل شد. برای ساخت کتابخانه cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (فرمنتاز؛ آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، از ۳ میکروگرم RNA تام و پرایمرهای oligo (dT) & random hexamer انجام و صحت ساخت cDNA با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تکثیر رونوشت ژن بتا‌اکتین به‌عنوان کنترل داخلی بررسی شد.

بررسی خاموش‌سازی siRNA: برای تایید و مشاهده مهار بیان mRNA مربوط به ژن HIF1 $\alpha$  از cDNAهای ساخته‌شده به‌عنوان الگو استفاده شد. محصولات رونویسی پی‌سی‌آر معکوس (RT-PCR) روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شدند. برای بررسی دقیق‌تر و کمی‌کردن میزان تاثیر siRNA در کاهش بیان ژن HIF1 $\alpha$  از تکنیک ریل‌تایم پی‌سی‌آر (Real Time PCR) استفاده شد. در این آزمایش از دستگاه ریل‌تایم 7500 (ABI؛ ایالات متحده) استفاده شد. در واکنش انجام‌شده، ۱۰ نانوگرم از cDNA، ۵ میکرولیتر مستر میکس EvaGreen Rox Plus (Solis BioDyne؛ استونی) به‌همراه ۴ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای فوروارد و ریورس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. صحت تکثیر و تک‌باندبودن قطعات به کمک آنالیز ذوب محصول یا بردن روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ (PAGE) بررسی شد.

است[14]، در حالی که کاهش عملکرد HIF-1 $\alpha$  منجر به کاهش رشد تومور و رگ‌زایی می‌شود[15]. بنابراین استراتژی‌هایی که به‌وسیله دارو یا ژن‌درمانی سبب کاهش بیان این ژن در سطح رونویسی یا ترجمه شوند، می‌توانند به‌عنوان کاندیدا در درمان سرطان به کار گرفته شوند[16]. آگاهی از اساس بیولوژی HIF، می‌تواند در هدف‌گیری دارویی مسیر HIF، برای درمان بیماری‌های مربوطه مفید باشد[17].

فناوری خاموش‌سازی ژن، راه جذابی را برای شناسایی ژن‌های مرتبط با بیماری، شناسایی مسیرهای مولکولی و یافتن راه‌های جدید درمانی فراهم می‌کند. از زمان تکمیل پروژه ژنوم انسان، اهداف دارویی جدید و بالقوه زیادی یافت شده‌اند[18]، اگرچه یک مانع مهم برای ترجمه اطلاعات حاصل از آنالیز ژنوم برای توسعه دارویی وجود دارد. برای تعیین عملکرد واقعی محصولات ژنی که در یک بیماری درگیر هستند و تاثیر درمانی خاموش‌سازی این محصولات ژنی، ریبوزیم‌ها و اولیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس برای یک mRNA هدف خاص استفاده شده‌اند.

فناوری RNAi یک پتانسیل بالقوه برای درک عملکرد ژن‌ها است[19]. RNAi که یک دورشته‌ای است، می‌تواند خاموش‌سازی توالی ژنی خاصی را میانجی‌گری کند[20]. عملکرد RNAi زمانی شروع می‌شود که یک دورشته‌ای RNA ابتدا به یک RNA مداخله‌کننده کوچک (siRNA)، یک محصول ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی دورشته‌ای با دو نوکلئوتید اضافی در ۳ و انتهای ۵ فسفریله، توسط یک کمپلکس دایسر در سیتوپلاسم شکافته می‌شود[21]. سپس siRNA به یک کمپلکس نوکلئازی چندجزئی به‌نام کمپلکس خاموش‌کننده القاشده توسط RNA (RISC) ملحق می‌شود. با توجه به اهمیت حضور ژن HIF1- $\alpha$  برای بقای سلول‌های سرطانی، در این مطالعه با استفاده از siRNA اختصاصی طراحی‌شده علیه ژن HIF1- $\alpha$ ، به مطالعه میزان کاهش بیان این ژن در رده سلولی گلیومای U87 و اثرات آن بر چرخه سلولی و مرگ سلولی پرداخته شد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف الفای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما به‌وسیله مهار ژن HIF-1 $\alpha$  انجام شد.

## مواد و روش‌ها

طراحی siRNA خاموش‌کننده HIF1 $\alpha$  mRNA: بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داده‌اند که ژن HIF1، سه واریانت را بیان می‌کند. در پژوهش تجربی حاضر، توالی‌های هر سه واریانت mRNA ژن هدف برای یافتن بهترین مکان برای طراحی siRNA کنار هم قرار داده شد. پس از بررسی‌های بیو، از توالی آنها برای طراحی RNA خاموش‌گر استفاده شد تا هر سه رونوشت (ترانسکرپت) ژن را شناخته و هدف تجزیه خود قرار دهد. با توجه به لزوم رديابی siRNA در داخل سلول، توالی به‌گونه‌ای طراحی شد که سر آن با رنگ فام (Fam) فلورسنت متصل باشد. برای

جدول ۱) توالی پرایمرها و siRNA استفاده‌شده

شماره دسترسی	توالی	طول محصول PCR	نوع
NM_002046.5	F: 5'-AGCCTTCCTTCCTGGGCATGG-3' R: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAGGTC-3'	۱۱۵ نوکلئوتید	بتا‌اکتین
NM_001243084.1	F: 5'-GCTTGCTCATAGTTGCCA-3' R: 5'-TCCAATCACCAGCATCCAG-3'	۳۲۳ نوکلئوتید	HIF1 $\alpha$
	Sense sense5' fam- TGGTATCATATACGTGAATGTTT3' Antisense 5'ACATTACGTATATGATACCATT3'		HIF1 $\alpha$ siRNA

سیکل دمایی دستگاه ریل تایم به صورت دنا تورا سیون اولیه به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل با ترتیب دمایی  $94^{\circ}\text{C}$  برای ۲۰ ثانیه،  $60^{\circ}\text{C}$  برای اتصال آغازگرها به مدت ۲۰ ثانیه و تکثیر در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن مورد مطالعه با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام شد [22]. در بررسی کمی توان خاموش‌سازی بیان ژن  $\text{HIF1}\alpha$  در سلول‌های ترنسفکت شده با دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر، از آنجایی که این تکنیک به تنهایی قادر به تمایز بین محصولات اختصاصی و غیراختصاصی نیست، آنالیز ذوب (Melt-Curve) برای محصولات حاصل از تکثیر انجام شد.

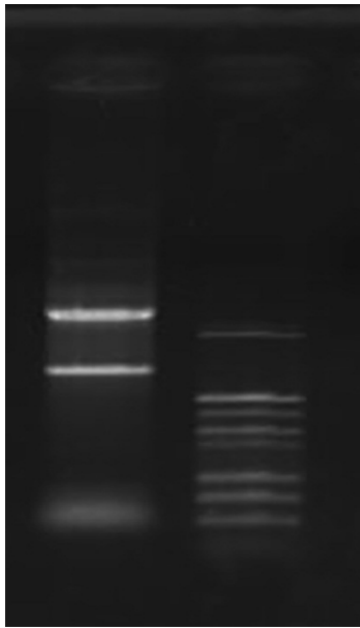
آنالیز چرخه سلولی با کمک تکنیک فلوسایتومتری: برای آنالیز چرخه سلولی، سلول‌های  $\text{U87}$  در پلیت ۱۲ خانه به وسیله siRNA تیمار شده و در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع‌آوری شدند. سپس با انجام سانتریفیوژ در  $1500$  دور در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه در  $4^{\circ}\text{C}$  سلول‌ها رسوب داده شدند. با اضافه کردن پروپیدایومیدید (PI) به سوسپانسیون سلولی، سلول‌ها به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری منتقل شدند.

در فلوسایتومتر براساس اندازه نور فلورسانس ساطع شده توسط هر سلول واحد، محتوای DNA آن تعیین شد. داده‌های حاصل با نرم‌افزار Flowing software 2.5.1 آنالیز شد.

برای آنالیز مرگ سلولی شامل آپتوز زودرس، آپتوز دیررس و نکروز، سلول‌ها پس از تیمار ۴۸ ساعته با siRNA جمع‌آوری شدند. رسوب سلولی در ۵ میکرولیتر محلول آنکسین-وی (راچ؛ سوئیس) کاملاً حل شده و بعد از ۱۰ دقیقه، ۵ میکرولیتر محلول PI به آن اضافه شد. سلول‌های تیمار شده به عنوان کنترل استفاده شد. در نهایت نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفتند و داده‌ها با نرم‌افزار دستگاه آنالیز شدند.

## یافته‌ها

حضور باندهای ۲۸S و ۱۸S و نسبت بین غلظت آنها مؤید صحت استخراج RNA از سلول‌ها بود (شکل ۱). siRNA اختصاصی طراحی شده برای ژن  $\text{HIF1}\alpha$  قادر به کاهش بیان ژن بود (شکل ۲).

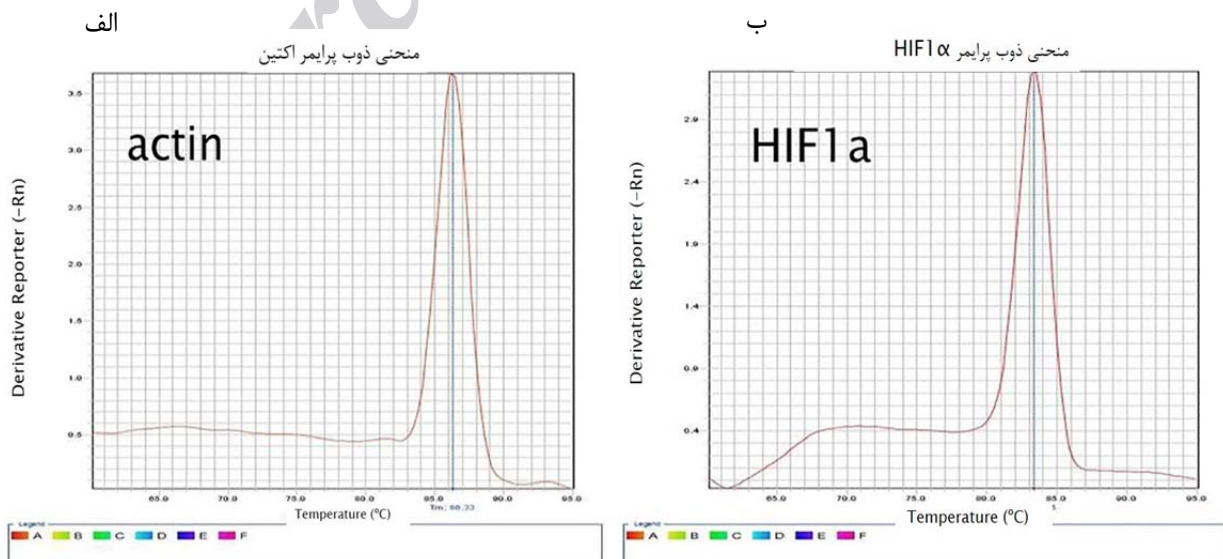


شکل ۱) نمونه‌ای از RNA استخراج شده از سلول‌های U87



شکل ۲) مشاهده کاهش بیان ژن  $\text{HIF1}\alpha$  پس از تیمار ۴۸ ساعته توسط تکنیک RT-PCR در مقایسه با نمونه کنترل؛ ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است.

پس از انجام روند تکثیر به منظور اطمینان از صحت عملکرد پرایمرهای طراحی شده از آنالیز منحنی ذوب پس از ۴۰ سیکل استفاده شد (نمودار ۱). در ارزیابی کمی بیان ژن با ریل تایم، siRNA طراحی شده، قادر به کاهش بیان به میزان ۴۰٪ بود (نمودار ۲).



نمودار ۱) آنالیز منحنی ذوب محصولات حاصل از تکثیر اختصاصی cDNA ژن‌های بتا اکتین و  $\text{HIF1}\alpha$  (الف) بتا اکتین (ب)  $\text{HIF1}\alpha$

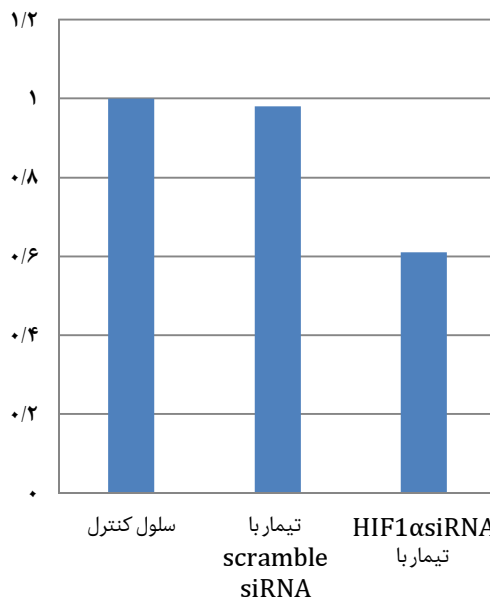


با توجه به کاهش بیان HIF1 $\alpha$ ، تغییرات چرخه سلولی و مرگ سلولی نیز با تکنیک فلوسایتومتری بررسی شد و تغییرات چرخه سلولی بیانگر این بود که تیمار سلول‌های U87 پس از ۲۴ ساعت، سبب افزایش ۶٪ سلول‌ها در مرحله sub G1 و پس از ۴۸ ساعت، سبب ۱۲٪ افزایش سلول‌ها در مرحله sub G1 شد. کاهش نسبی سلول‌ها در مرحله G1، افزایش sub G1 و S در سلول‌های ترنسفکت شده با siRNA نشان داده شد (جدول ۲؛ نمودار ۳ و ۴).

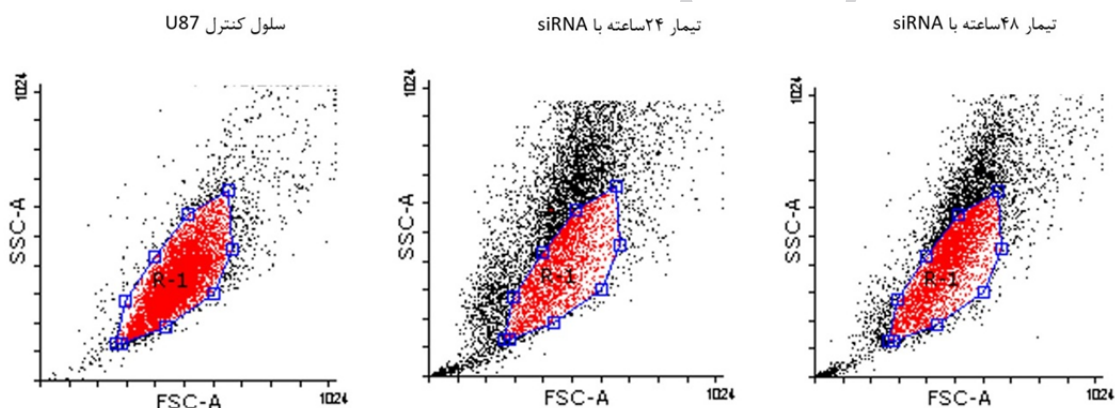
جدول ۲) تغییرات چرخه سلولی در سلول‌های U87 پس از ترنسفکشن ۲۴ و ۴۸ ساعته و سلول‌های کنترل

تیمار	G1 (درصد)	Sub G1 (درصد)	S (درصد)	G2/M (درصد)
کنترل	۵۸/۷۹	۱۲/۲۱	۶/۲۸	۱۹/۶۵
تیمار ۲۴ ساعته	۳۹/۸۳	۱۸/۱۲	۱۱/۴۷	۲۵/۰۹
تیمار ۴۸ ساعته	۴۶/۰۸	۲۴/۶۸	۶/۵۵	۲۰/۲۴

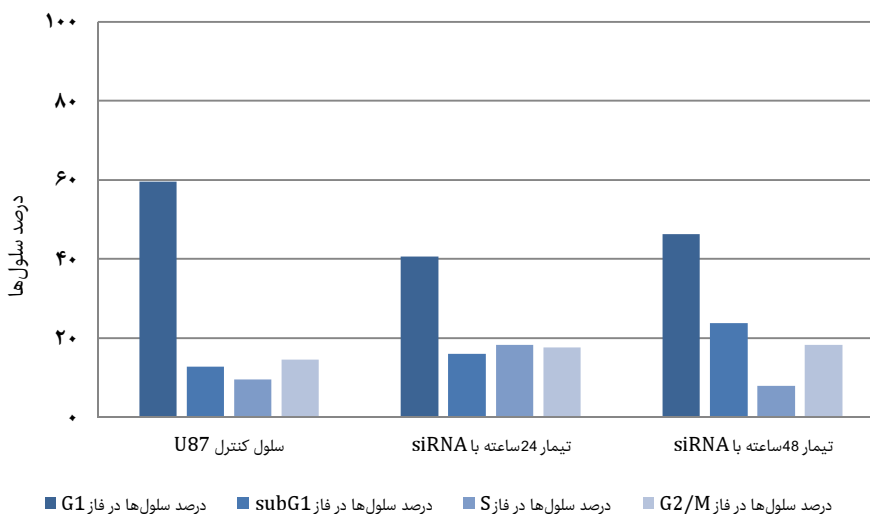
در تایید تغییرات چرخه سلولی، تیمار ۴۸ ساعته با siRNA سبب القای آپوتوز در ۵۸٪ سلول‌ها شد که با توجه به میزان ۱۵٪ درصدی آپوتوز در سلول‌های کنترل، این مقدار مرگ سلولی بسیار چشمگیر بود و توانایی siRNA طراحی شده را در القای آپوتوز نشان می‌داد (جدول ۳؛ نمودار ۵ و ۶).



نمودار ۲) تاثیرات کاهش بیان ژن HIF1 $\alpha$  پس از تیمار ۴۸ ساعته با siRNA اختصاصی طراحی شده علیه ژن HIF1 $\alpha$  نسبت به نمونه کنترل



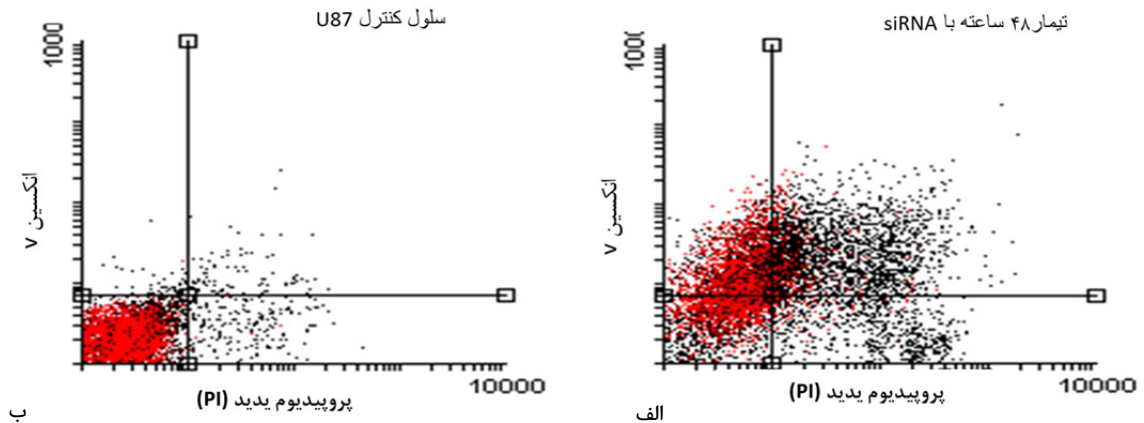
نمودار ۳) توزیع سلولی پس از تیمار ۲۴ ساعته، ۴۸ ساعته و کنترل



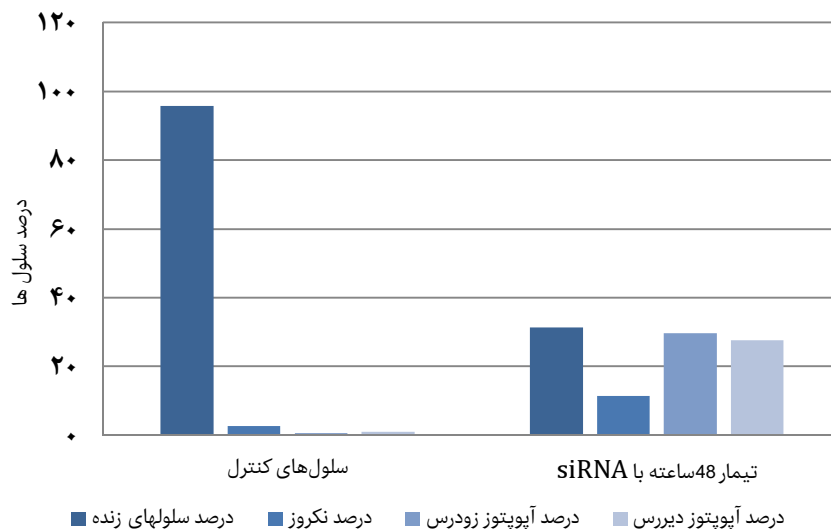
نمودار ۴) تغییرات چرخه سلولی در سلول‌های U87 پس از تیمار ۲۴، ۴۸ ساعته و کنترل در مرحله G1، sub G1، S و G2/M

جدول ۳) آنالیز مرگ سلولی در سلول‌های U87 در سلول‌های تیمار شده پس از ۴۸ ساعت و کنترل

سلول‌های تیمار شده	سلول‌های کنترل	نوع
۳۱/۳۲	۹۵/۸۵	سلول‌های سالم
۱۱/۴۳	۲/۶	نکروز
۲۹/۵۹	۰/۵۸	آپوپتوز اولیه
۲۷/۶۶	۰/۹۷	آپوپتوز ثانویه



نمودار ۵) پراکندگی سلولی در سلول‌های کنترل و تیمار شده پس از ۴۸ ساعت (الف) سلول‌های تیمار شده U87 (ب) سلول‌های کنترل



نمودار ۶) درصد پراکندگی سلول‌ها در القای مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده پس از ۴۸ ساعت در هر فاز و سلول‌های کنترل

توانایی خاموش کردن ژن در سطح mRNA را داشت. برای پی‌بردن به تاثیر این کاهش بیان در روند چرخه سلولی و آپوپتوز، رنگ‌آمیزی با PI و آنکسین-PI انجام شد و با تکنیک فلوسایتومتری، تعداد سلول‌ها در هر فاز و نیز میزان انواع مرگ‌ومیر سلولی با نمونه کنترل مقایسه شد. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌ها در مرحله  $G_1$  در مقایسه با نمونه کنترل به شدت افت کرد و تعداد سلول‌ها در مرحله  $sub\ G1$  در روندی وابسته به زمان افزایش یافت. همچنین، در مطالعه دیگری که از siRNA برای خاموشی ژن HIF1 $\alpha$  استفاده شده است، توقف چرخه سلولی و افزایش مرحله  $sub\ G1$  مشاهده شده است [25].

به نظر می‌رسد که اثر HIF1 $\alpha$  روی چرخه سلولی می‌تواند به میان‌کنش این پروتئین با پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی

### بحث

هدف پژوهش حاضر، بررسی امکان القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما به وسیله مهار ژن HIF-1 $\alpha$  بود. به دلیل وجود ارتباط اثبات شده‌ای که بین HIF و سرطان وجود دارد، تا به حال مولکول‌های متنوعی برای مهار مسیر آن مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از آن جمله می‌توان به مولکول‌های بازدارنده، پپتیدها، فناوری آنتی‌سنس و ژن‌درمانی اشاره کرد [23, 24]. در این مطالعه، توانایی siRNA طراحی شده در کاهش بیان ژن HIF1 $\alpha$ ، تاثیرات کاهش عملکرد احتمالی ژنی بر چرخه سلولی و به دنبال آن مرگ‌ومیر سلولی در رده گلیوما مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا، میزان تاثیر siRNA در کاهش بیان ژن به وسیله RT-PCR و ریل‌تایم پی‌سی‌آر ارزیابی شد. نتایج نشان دادند siRNA طراحی شده به میزان ۴۰%

نانوذرات در آینده نزدیک کمک گرفته شود تا بتوان مدت زمان حضور این مولکول‌ها را در بدن و سیستم گردش خون افزایش داد و از تجزیه زودهنگام آنها جلوگیری کرد. پیشنهاد می‌شود این مطالعه روی رده‌های سرطانی متنوع‌تر در فازهای مختلف انجام گیرد و در نهایت در محیط *in vivo* انجام شود.

### نتیجه‌گیری

کاهش بیان ژن HIF-1 $\alpha$  بر روند رشد سلول‌ها و افزایش آپوپتوز تاثیر قابل ملاحظه‌ای دارد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس قدرانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود نداشت.

سهم نویسندگان: سهامه محبی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ مهرداد بهمنش (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ مریم نیکخواه (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ طاهره توحیدی‌مقدم (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: این تحقیق با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

### منابع

- 1- Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, et al. American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: Reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):30-67.
- 2- World Health Organization. Cancer Fact sheet N°297 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014. [cited 2016 Sep 19?]. Available from: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- 3- National Cancer Institute. Defining Cancer [Internet]. Rockville: National Cancer Institute; 2014. [cited 2016 Sep 19]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- 4- Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: A review. *Cancer Res.* 1987;47(12):3039-305.
- 5- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-8.
- 6- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5546):468-72.
- 7- Lee W, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ): Its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004;36(1):1-12.
- 8- Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):38-47.
- 9- Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS

مرتبط باشد. اطلاعاتی نیز وجود دارد که نشان داده‌اند توقف چرخه سلولی می‌تواند به فعالیت پروتئین‌های P21 و P27 مرتبط باشد<sup>[26]</sup>. مطالعه حاضر نیز نشان داد که عدم عملکرد کافی ژن HIF1 $\alpha$  می‌تواند سبب نامتعادل شدن چرخه سلولی و آسیب به DNA شود. یکی از نشانه‌های شناخته‌شده در اکثر سرطان‌ها، نقص در آپوپتوز است. در تیمار ۴۸ ساعته، ۵۸٪ از سلول‌ها در مرحله آپوپتوز قرار داشتند. تا کنون در مطالعات زیادی به نقش HIF1 $\alpha$  در واسطه‌گری آپوپتوز در سلول‌های توموری اشاره شده است<sup>[27]</sup>. گویی با کاهش بیان این ژن، دفاع ضدآپوپتوزی سلول برداشته شده و مسیرهای پیش‌برنده مرگ سلولی تحریک می‌شوند. در پژوهش‌های پیشین ثابت شده است که ظهور مرحله sub G<sub>1</sub> می‌تواند نشانه‌ای از آسیب به DNA باشد<sup>[29]</sup> و عواملی که به DNA یا دوک تقسیم آسیب می‌رسانند، می‌توانند سبب آپوپتوز یا توقف چرخه سلولی شوند که این توقف معمولاً در مرز G1/S یا G2/M رخ می‌دهد<sup>[30]</sup>.

در پژوهش مشابهی که در سال ۲۰۰۳ انجام شده است، مشخص شد که کاهش بیان این ژن توانسته است، سبب افزایش آپوپتوز و القای مرگ سلولی از طریق مسیر سیگنالینگ همراه با پروتئین BAX و افزایش مرگ سلولی با واسطه P53 شود<sup>[31]</sup>. بنابراین نتایج مطالعه حاضر با پژوهش‌های ذکرشده همخوانی داشت. در چندین پژوهش دیگر که از siRNA برای کاهش بیان ژن HIF1 $\alpha$  استفاده شده، مشخص شده است که بیان این ژن، بسیاری از مسیرهای متابولیکی را فعال کرده و مهار آن سبب تغییر فعالیت‌های متابولیکی سلول می‌شود<sup>[32]</sup>. همچنین، نقش ضدآپوپتوزی HIF1 $\alpha$ <sup>[27]</sup> و ارتباط آن با p53<sup>[33]</sup> نیز به اثبات رسیده است. در مطالعه دیگری که از حامل آدنوویروسی برای انتقال siRNA ژن HIF1 $\alpha$  استفاده شده است، حدود ۹۰٪، کاهش بیان ژن در سطح mRNA و پروتئین مشاهده شده است. دلیل این مقدار کاهش بیان در این پژوهش می‌تواند به دلیل استفاده از چندین توالی siRNA به‌صورت همزمان و توانایی بالای ترنسفاکشن حامل‌های آدنوویروسی باشد. در این مطالعه، بیان کاسپاز ۳ که یک محرک آپوپتوز و نیز bcl-X1 که تنظیم‌کننده منفی آپوپتوز است، پس از تیمار مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده بود که بیان کاسپاز ۳ در نتیجه عمل siRNA افزایش یافته و سلول را به سوی آپوپتوز هدایت کرده است<sup>[34]</sup>.

در حال حاضر برخی از بازدارنده‌های HIF1 $\alpha$  در مرحله آزمایشات کلینیکی هستند و نشان داده شده است که siRNAهای خاصی می‌تواند سبب کاهش بسیار زیاد در بیان این ژن شوند<sup>[35, 36]</sup>. در اکثر سرطان‌های انسانی از جمله گلیوما، افزایش بیان HIF1 $\alpha$  سبب رشد تومور، رگ‌زایی و پیشرفت بیماری می‌شود. بنابراین هدف از قراردادن HIF1 $\alpha$  می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی ضدسرطان قابل استفاده در درمان مورد توجه قرار گیرد<sup>[37, 38]</sup>. به نظر می‌رسد که مهار HIF1 $\alpha$  به‌وسیله فناوری RNA مداخله‌کننده می‌تواند یک استراتژی بالقوه برای درمان بسیاری از سرطان‌ها در کنار دیگر داروهای بازدارنده مانند تمسیرولیموس (temsirolimus)، اورولیموس (everolimus) و سیس‌پلاتین (cisplatin) باشد<sup>[39]</sup>.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به زمان کوتاه نیمه‌عمر siRNA در درون بدن اشاره کرد، چرا که می‌تواند سریع تحت تاثیر نوکلئازها تجزیه شود و نیمه‌عمر پایینی داشته باشد. لذا پیشنهاد می‌شود از سامانه‌های تحویل‌دهنده مبتنی بر فناوری نانو و

- signaling and affects cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(3):571-7.
- 26- Green SL, Freiberg RA, Giaccia AJ. p21(Cip1) and p27(Kip1) regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary for hypoxia-induced arrest. *Mol Cell Biol.* 2001;21(4):1196-206.
- 27- Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michieles C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer.* 2010;9:191.
- 28- Khan MN, Bhattacharyya T, Andrikopoulos P, Esteban MA, Barod R, Connor T. Factor inhibiting HIF (FIH-1) promotes renal cancer cell survival by protecting cells from HIF-1alpha-mediated apoptosis. *Br J Cancer.* 2011;104(7):1151-9.
- 29- Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A.* 2007;71(3):125-31.
- 30- Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem.* 2001;276(11):7919-26.
- 31- Wang Y, Pakunlu RI, Tsao W, Pozharov V, Minko T. Bimodal effect of hypoxia in cancer: Role of hypoxia inducible factor in apoptosis. *Mol Pharm.* 2004;1(2):156-65.
- 32- Chen Ch, Yu Z. siRNA targeting HIF-1alpha induces apoptosis of pancreatic cancer cells through NF-kappa B independent and -dependent pathways under hypoxic conditions. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1367-72.
- 33- Hammond EM, Giaccia AJ. The role of p53 in hypoxia induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(3):718-25.
- 34- Zhang X, Kon T, Wang H, Li F, Huang Q, Rabbani ZN, et al. Enhancement of hypoxia-induced tumor cell death in vitro and radiation therapy in vivo by use of small interfering RNA targeted to hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Cancer Res.* 2004;64(22):8139-42.
- 35- Welsh S, Williams R, Kirkpatrick L, Paine-Murrieta G, Powis G. Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(3):233-44.
- 36- Wu XA, Sun Y, Fan QX, Wang LX, Wang RL, Zhang L. Impact of RNA interference targeting hypoxia-inducible factor-1alpha on chemosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma cells under hypoxia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007;87(37):2640-4. [Chinese]
- 37- Kimura S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Hihara J, Yoshida K, et al. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha is associated with vascular endothelial growth factor expression and tumour angiogenesis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2004;40(12):1904-12.
- 38- Kurokawa T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kawarada Y, Hida Y, et al. Overexpression of hypoxia-inducible-factor 1alpha(HIF-1alpha) in oesophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Br J Cancer.* 2003;89(6):1042-7.
- 39- Seeber LM, Zweemer RP, Verheijen RH, van Diest PJ. Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in endometrial cancer management. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:580971.
- domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 1997;11(1):72-82.
- 10- Ema M, Taya Sh, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4273-8.
- 11- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr.* 1998;7(3):205-13.
- 12- Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 $\alpha$  promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 2006;10(5):413-23.
- 13- Baba Y, Noshio K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2292-301.
- 14- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 2000;60(15):4010-5.
- 15- Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 2004;9(Suppl 5):10-7.
- 16- Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in Malignancy and Ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007;80(2):51-60.
- 17- Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1alpha and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res.* 2010;180:15-34.
- 18- Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(9):727-30.
- 19- Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2005;107(2):222-39.
- 20- Couzin J. Breakthrough of the year, Small RNAs make big splash. *Science.* 2002;298(5602):2296-7.
- 21- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409(6818):363-6.
- 22- Farsani ZSh, Behmanesh M, Sahraian MA. Interleukin-10 but not transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression is up-regulated by vitamin D treatment in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2015;350(1-2):18-23.
- 23- Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, et al. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res.* 2004;64(15):4316-24.
- 24- Sun X, Kanwar JR, Leung E, Lehnert K, Wang D, Krissansen GW. Gene transfer of antisense hypoxia-inducible factor-1a enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther.* 2001;8(8):638-45.
- 25- Hänze J, Eul BG, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F. RNA interference for HIF-1a inhibits its downstream