

## القای آپوتوز و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی پستان از طریق مهار MicroRNA-182-5p Locked Nucleic Acid با استفاده از (miR-182-5p)

محمدرضا شریفی<sup>۱</sup>، عباس مریدنیا<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** MicroRNAs (miRNAs)، RNAهای کوچک تک رشته‌ای و غیر کد کننده‌ای می‌باشند که در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش دارند. MicroRNAها، نقش مهمی در فرایندهای مختلف سلولی شامل تکثیر سلولی، تمایز، چرخه‌ی سلولی، آپوتوز و پیشرفت سرطان از طریق تنظیم منفی تومور ساپرسورها یا انکوژن‌ها ایفا می‌کنند. سرطان پستان، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در دنیا می‌باشد. مطالعات نشان داده است که بیان miR-182 در سرطان پستان افزایش می‌یابد.

**روش‌ها:** مهار miR-182-5p در سلول‌های سرطان پستان (رده‌ی سلولی MCF-7 یا Michigan cancer foundation-7) با استفاده از Locked nucleic acid (LNA) انجام شد. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن (Transfection)، بیان miR-182-5p به روش Reverse transcription-Quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) بررسی گردید. همچنین، تکثیر سلولی به روش Annexin-V/propidium iodid (MTT) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide و آپوتوز و نکروز با استفاده از بررسی گردید.

**یافته‌ها:** بیان miR-182-5p در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن در گروه ترانسفکشن شده با LNA نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. تکثیر سلولی در گروه ترانسفکشن شده با LNA، نسبت به گروه‌های دیگر نیز کاهش نشان داد. نسبت آپوتوز در گروه ترانسفکشن شده با LNA نسبت به گروه‌های شاهد به علت مهار miR-182-5p افزایش داشت. همچنین، نسبت نکروز نیز به طور مشابهی در گروه ترانسفکشن شده با LNA نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** مهار miR-182-5p باعث کاهش تکثیر سلولی در رده‌ی سلولی سرطان پستان می‌شود که به طور عمده به دلیل القای آپوتوز و نکروز در این رده‌ی سلولی می‌باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند در طب ترجمه‌ای برای هدف درمانی کمک کننده باشد.

**واژگان کلیدی:** تکثیر سلول، آپوتوز، سرطان پستان

**ارجاع:** شریفی محمدرضا، مریدنیا عباس. القای آپوتوز و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی پستان از طریق مهار MicroRNA-182-5p (miR-182-5p) با استفاده از Locked Nucleic Acid. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۱۸): ۶۳-۵۷

### مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان با ۲۹ درصد سرطان‌های تشخیص داده شده و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان است. حدود ۶۱۰۰۰ مورد سرطان پستان در سال ۲۰۱۶ تشخیص داده شده است (۱). از نظر بالینی، سرطان پستان یک بیماری هتروژن با زیر گروه‌هایی است که از لحاظ هیستوپاتولوژیک شامل گیرنده‌ی استروژن مثبت/منفی و گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمال انسانی مثبت/منفی بر اساس

فهرست‌بندی با استفاده از بیان ژن می‌باشد (۳-۲).

miRNAs، RNAهای تک رشته‌ای کوچک (۲۵-۱۹ نوکلئوتیدی) می‌باشند که mRNAهای هدف را کنترل می‌کنند. نقش miRNAs در بعضی سرطان‌ها به ویژه سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفته است (۵-۴). miRNAs در سرطان پستان، می‌توانند به عنوان یک انکوژن یا تومور ساپرسور عمل کنند (۷-۵، ۲).

۱- استادیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: a\_moridnia@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: عباس مریدنیا

پاستور، تهران، ایران) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Gibco, UK) حاوی Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد حجمی/حجمی، FBS ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma-Aldrich, USA) در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع با ۵ درصد CO<sub>2</sub> در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای حفظ سلول‌ها در مرحله‌ی لگاریتمی، این سلول‌ها دو بار در هفته پاساژ داده شدند.

**ترانسفکشن (Transfection) سلولی:** با استفاده از وب‌سایت [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org) توالی miR-182-5p به دست آمد که شامل (MIMAT 0000259) ۳'-UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU-5' بود. miRCURY LNA به عنوان مهار کننده‌ی hsa-miR-182-5p و Scrambled (Exiqon, Denmark) به عنوان شاهد منفی خریداری شد. الیگونوکلئوتیدهای LNA anti-miR-182-5p و scrambled در پایانه‌ی ۵ پریم با رنگ فلورسنت 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) نشان‌دار شده بودند. ترانسفکشن سلول‌های MCF-7 با استفاده از PolyFect™ transfection reagent kit (Qiagen, Germany) و بر اساس شیوه‌نامه‌ی این شرکت انجام گردید. تعداد ۱۰<sup>۵</sup> × ۵ سلول در مرحله‌ی لگاریتمی در پلیت کشت ۶ خانه کاشته شد و ۱/۸ میلی‌لیتر RPMI 1640 بدون FBS و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک اضافه گردید. ۴۰ پیکومول miRCURY LNA با ۴ میکرولیتر PolyFect™ در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت Opti-MEMI (Gibco, UK) مخلوط شد و بعد از آن، ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس، این کمپلکس به سلول‌های MCF-7 اضافه گردید. بعد از ۸ ساعت انکوباسیون، FBS و آنتی‌بیوتیک به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. سلول‌های ترانسفکت نشده، به طور هم‌زمان با سلول‌های ترانسفکت شده با LNA-anti-miR-182-5p و Scrambled کشت داده شدند. ارزیابی ترانسفکشن سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت انجام گردید.

**بررسی بیان miR-182-5p** برای تعیین کارایی مهار miR-182-5p با استفاده از LNA، بیان miR-182-5p به روش Reverse transcription-Quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) در سلول‌های MCF-7 بررسی گردید. برای استخراج RNA از miRCURY RNA isolation kit (Exiqon, Denmark) استفاده در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن سلولی استفاده گردید. برای سنتز Complementary DNA (cDNA) از Universal cDNA synthesis kit (Exiqon, Denmark) استفاده

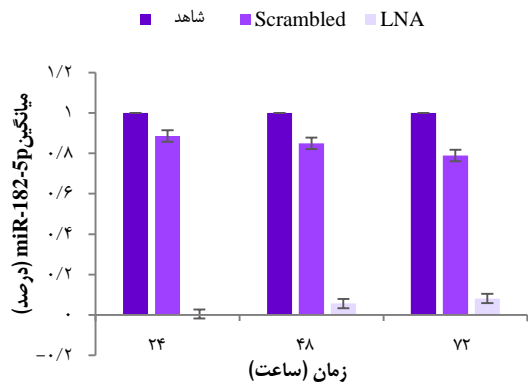
ارتباط گسترده‌ی miRNAs و mRNAهای هدف آن‌ها، فرایندهای سلولی مهمی را در ارتباط با زیست‌شناسی سرطان پستان و بقای آن نشان داده است. سرطان پستان، یکی از اولین سرطان‌هایی می‌باشد که پروفایل بیانی miRNAs آن توصیف شده است. پروفایل بیانی miRNAs می‌تواند برای تمایز بین سلول‌های بافت سرطانی و طبیعی در سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد (۹-۸). افزایش بیان miR-21 از طریق هدف قرار دادن تومور ساپرسور ژن‌های PTEN، PDCD4 و TPM1، با بقا و تکثیر سلولی در سرطان پستان ارتباط دارد. همچنین، افزایش بیان miR-21 با پیشرفت مراحل بالینی، پیش‌آگهی ضعیف و متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط است (۱۱-۱۰). از طرف دیگر، miRNAهای کاهش بیان یافته miR-205 و miR-125b، تنظیم کننده‌ی ژن‌های انکوژن‌های تیروزین کیناز گیرنده‌های HER-2 و HER-3 می‌باشند (۱۳-۱۲). بعضی از miRNAs، نقش دوگانه‌ای به عنوان انکوژن و تومور ساپرسور بازی می‌کنند که به خاطر پیچیدگی شبکه‌های ژنی هدف miRNAs و سطح بیان رونوشت‌های هدف آن‌ها می‌باشد. این نقش، می‌تواند به عنوان مراکز زیستی کلیدی کمک کننده به پیامد بیماری عمل کند. miR-182، یکی از miRNAهایی می‌باشد که دارای نقش دوگانه است و در منطقه‌ی 7q32.2 ژنوم انسان قرار گرفته است. miR-182 در سرطان پستان افزایش بیان دارد و ویژگی‌های تومورزایی آن در ملانوما و سرطان اندومتریم گزارش شده است (۱۷-۱۴). در مطالعه‌ی بر روی بیان miR-182 در زیر گروه‌های مختلف سرطان پستان نشان داده شد که بیان miR-182 در همه‌ی زیر گروه‌ها نسبت به بافت سالم افزایش بیان بالایی دارد (۱۴). miR-182 باعث افزایش متاستاز هیپاتوسلولار کارسینوما و جلوگیری از بیان MTSS1 می‌شود. ارتباط بین افزایش بیان miR-182 و پیشرفت سرطان پروستات در مطالعات نشان داده شده است. مهار miR-182-5p، منجر به افزایش بیان ژن‌های تومور ساپرسور MTSS1، FOXF2 و RECK در سرطان پروستات شده است (۱۸). همچنین، افزایش بیان miR-182 با نقص در RCA1، MTSS1 و HMGA2 در سرطان تخمدان مرتبط می‌باشد (۱۹).

نتایج مطالعه پیشنهاد کننده‌ی اثر ضد تکثیری مهار miR-182-5p در سرطان پستان می‌باشد. در این مطالعه، مهار miR-182-5p به وسیله‌ی Locked nucleic acid (LNA) انجام گردید و تأثیر آن بر تکثیر سلولی، آپوپتوز و نکروز در رده‌ی سلولی Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) مورد بررسی قرار گرفت.

## روش‌ها

**کشت سلولی:** رده‌ی سلولی MCF-7 از بانک سلولی ایران (انسیتوز

بیان *miR-182-5p* ارزیابی بیان *miR-182-5p* در سلول‌های MCF-7 ترانسفکت شده با Scrambled LNA و شاهد، به روش qPCR در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن سلولی انجام شد. نتایج qPCR نشان داد که بیان *miR-182-5p* در هر سه زمان در گروه ترانسفکت شده با LNA نسبت به دیگر گروه‌ها کاهش زیادی دارد ( $P < 0/018$ ). پایین‌ترین سطح بیان *miR-182-5p* در ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن بود (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی بیان *MicroRNA-182-5p* (miR-182-5p) به روش **Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)** در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن (Transfection) انجام شد. روش  $\Delta\Delta Ct$  برای آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های ترانسفکت نشده، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در هر سه بار تکرار آزمایش می‌باشند.  
LNA: Locked nucleic acid

**تکثیر سلولی:** برای ارزیابی تأثیر مهار *miR-182-5p* بر تکثیر سلول‌های سرطان پستان، روش MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن در سلول‌های MCF-7 انجام گردید. تکثیر سلولی در گروه ترانسفکت شده با LNA کاهش چشمگیری را از خود نشان داد ( $P < 0/026$ ). تکثیر سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده با LNA در طول زمان کاهش داشت و به ۴۵/۱ درصد در ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن رسید. تکثیر سلولی در سلول‌های ترانسفکت شده با Scrambled نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده کمتر بود، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲).

**آپتوز و نکروز سلولی:** تأثیر مهار *miR-182-5p* بر آپتوز و نکروز در سلول‌های MCF-7 با به کارگیری Annexin-V و PI در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن مورد بررسی قرار گرفت. در گروه LNA، نسبت آپتوز افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0/021$ ). نسبت آپتوز در گروه Scrambled نسبت به

شده. با استفاده از SYBR green master mix kit (Exiqon, Denmark) و پرایمرهای اختصاصی برای *miR-182-5p* (Exiqon, Denmark)، qPCR microRNA انجام گردید. از U6 به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. همچنین، از دستگاه ABI step one plus (Applied biosystems, USA) و روش  $\Delta\Delta Ct$  برای آنالیز داده‌ها در آزمایش‌های qPCR استفاده گردید.

**بررسی تکثیر سلولی:** ارزیابی تکثیر سلولی در سلول‌های MCF-7 به روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن سلولی انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر MTT (Sigma-Aldrich, USA) با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به  $5 \times 10^5$  سلول در ۲ میلی‌لیتر در محیط RPMI 1640 اضافه گردید و سپس، در تاریکی در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴ ساعت انکوبه شد. پس از آن، ۲۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانش شد.

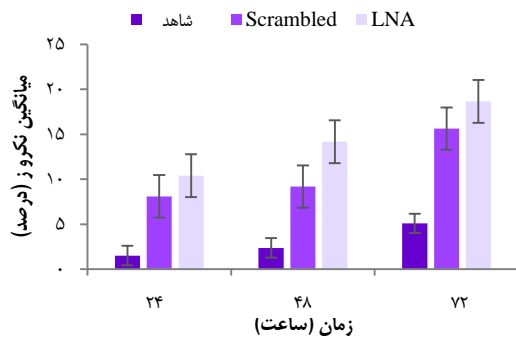
**بررسی آپتوز و نکروز سلولی:** با استفاده از Fluorescein isothiocyanate (FITC) Annexin-V/PI kit (Bio legend, USA)، آپتوز و نکروز در سلول‌های MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. در سلول‌های آپتوز شده، فسفاتیدیل سرین بر روی سطح سلول قرار می‌گیرد که توسط Annexin-V قابل شناسایی می‌باشد. سلول‌های نکروز شده به وسیله Propidium iodide (PI) شناسایی می‌شوند. در این روش، سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بررسی آپتوز و نکروز در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن سلولی، بر اساس شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده‌ی کیت انجام شد و سلول‌ها با به کارگیری FACS caliber flow cytometer (BD, USA) بررسی شد.

**آنالیز آماری:** در این مطالعه، همه‌ی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد. آزمون‌های Two-way ANOVA و همچنین، Scheffee و Tukey به عنوان آزمون تعقیبی Post hoc مورد استفاده قرار گرفتند.

### یافته‌ها

**ترانسفکشن سلولی:** از آن جایی که LNA و Scrambled با استفاده از یک رنگ فلوروسکوپی نشان‌دار شده بودند، ارزیابی ترانسفکشن سلولی به وسیله‌ی میکروسکوپی فلورسسنس انجام گردید. ترانسفکشن سلولی در سلول‌های MCF-7 حدود ۸۰ درصد تخمین زده شد.

Scrambled نسبت به گروه شاهد نشان داد که از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. به هر حال، نسبت نکروز در گروه LNA نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت ( $P < 0.017$ ) (شکل ۴).



شکل ۴. بررسی نکروز با استفاده از Annexin-V/PI

در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن (Transfection) انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در هر سه بار تکرار آزمایش می‌باشند. LNA: Locked nucleic acid

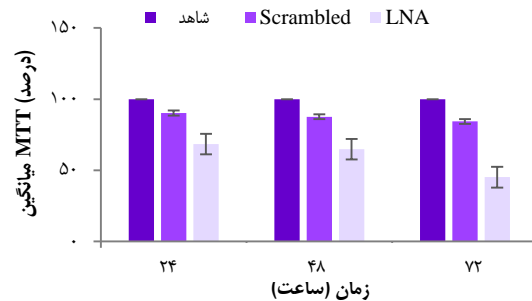
### بحث

تنظیم نادرست بیان miRNAها در سرطان‌ها و به ویژه سرطان پستان توصیف شده است. miRNAها در زیر گروه‌های مختلف سرطان پستان بیان متفاوتی به صورت افزایش یا کاهش از خود نشان داده‌اند (۳-۵). بیان متفاوت miR-182 و تأثیر آن در زیست‌شناسی سلول‌های مبتلا به سرطان گزارش شده است. miR-182 در کلاستر miR-183/96/182 در ناحیه 7q32.2 قرار دارد و در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان افزایش می‌یابد (۲۰-۱۹).

در چندین مطالعه، افزایش بیان miR-182 در سرطان کلون، پروستات، ریه و گلیوما مشاهده شده است. miR-182 در بیماران مبتلا به گلیوما با متاستاز با پیش‌آگهی ضعیف در ارتباط می‌باشد. miR-182 در بافت‌ها و سلول‌های سرطان پستان Triple-negative افزایش بیان دارد و موجب به افزایش تکثیر و تهاجم در رده سلولی MDA-MB-231 می‌شود. تنظیم منفی PFN1 و FOXO1 با افزایش miR-182 مرتبط است (۲۲-۲۱).

بیان BRCA1 در تومورهای سرطان پستان اسپورادیک کاهش می‌یابد و با پیش‌آگهی ضعیف در این بیماران ارتباط دارد. MiR-182 بیان BRCA1 را کاهش می‌دهد و باعث آسیب در تعمیر DNA می‌گردد؛ در حالی که به نظر می‌رسد افزایش بیان miR-182 مستقل از TP53 باشد (۲۴-۲۳). TP53 ممکن است تنظیم کننده بیان miR-182 باشد (۲۵). ویژگی‌های انکوژنی miR-182 با تنظیم منفی تومور ساپرسور ژن‌های FOXO1 (۲۶)، FOXO3، MIF-M،

سلول‌های شاهد افزایش یافته بود، اما این اختلاف، از نظر آماری معنی‌دار نبود.



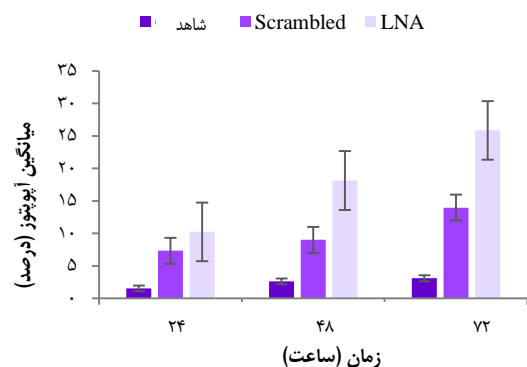
شکل ۲. بررسی تکثیر سلولی به روش

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از

ترانسفکشن (Transfection) انجام شد. تکثیر سلولی سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان ۱۰۰ درصد در هر زمان در نظر گرفته شد و تکثیر سلولی دیگر گروه‌ها، به صورت درصد نسبت به سلول‌های ترانسفکت نشده نشان داده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در هر سه بار تکرار آزمایش می‌باشند.

LNA: Locked nucleic acid

افزایش آپوپتوز به علت بالاتر بودن آن در هر سه زمان در گروه ترانسفکت شده با LNA نسبت به دیگر گروه‌ها، نشان دهنده ارتباط آن با مهار miR-182-5p می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی آپوپتوز با استفاده از Annexin-V/PI

در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ترانسفکشن (Transfection) انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در هر سه بار تکرار آزمایش می‌باشند. LNA: Locked nucleic acid

از طرف دیگر، ارزیابی نکروز در سلول‌های MCF-7 در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، مقدار کمی افزایش در گروه

نتایج مطالعه، نقش انکوژنی miR-182-5p را به عنوان ضد تکثیر سلولی برای سرطان پستان با مهار اختصاصی آن به وسیله‌ی LNA-anti-miR-182-5p نشان داد. راهبردهای درمانی با به کارگیری miRNAs، به تازگی به مرحله‌ی کارآزمایی بالینی رسیده است و پیش‌بینی می‌شود که به عنوان وسیله‌ای برای درمان سرطان در نظر گرفته شود. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مهار miR-182-5p با استفاده از LNA، باعث القای آپوپتوز، نکروز و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های سرطان پستان می‌شود.

از محدودیت‌های این پژوهش، می‌توان به مشکل بودن Set up کردن ترانسفکشن و دسترسی نداشتن به سلول‌های واقعی تومور برای انجام مطالعه بر روی آن‌ها نام برد. بر اساس نتایج این مطالعه، احتمال می‌رود مهار miR-182-5p با استفاده از LNA، می‌تواند به تنهایی و یا به صورت ترکیب با دیگر روش‌های درمانی برای درمان سرطان پستان به کار رود و این نتایج، می‌تواند در طب ترجمه‌ای برای تحقیقات بر روی آنتی‌سنس تراپی (Antisense therapy) در سرطان پستان به کار رود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تصویب شده در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی ۱۹۴۱۱۳ می‌باشد. بدین وسیله، از این دانشگاه جهت تأمین هزینه‌ی اجرای این مطالعه قدردانی می‌گردد.

MTSS1 و BRCA1 نشان داده شده است (۲۷). miR-182 ممکن است از طریق تومورزایی و ارتباط با TP53 باعث افزایش پیشرفت سرطان تخمدان شود (۱۹).

در این مطالعه، از LNA-anti-miR-182-5p برای مهار کردن miR-182-5p در رده‌ی سلولی MCF-7 استفاده گردید. کاهش بیان miR-182-5p بعد از ترانسفکشن سلولی با LNA به طور تقریبی به صفر رسید و این کاهش بیان، به وسیله‌ی روش qRT-PCR تأیید شد. بعد از ترانسفکشن، هر چه که زمان می‌گذرد، LNA از miR جدا می‌شود و miRs تولیدی جای آن را می‌گیرد؛ به همین دلیل، با گذشت زمان بیان miR افزایش می‌یابد. کاهش تکثیر سلولی به روش MTT نشان دهنده‌ی ارتباط آن با مهار miR-182-5p بود. افزایش میزان آپوپتوز و نکروز با استفاده از روش Annexin-V و PI در رده‌ی سلولی MCF-7 بعد از ترانسفکشن LNA تأیید شد. بر اساس این نتایج، مهار miR-182-5p به طور عمده به علت القای آپوپتوز و کاهش تکثیر سلولی، می‌تواند باعث کاهش تکثیر سلولی در رده‌ی سلولی MCF-7 شود.

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که مهار miR-182-5p در سرطان پستان می‌تواند برای اهداف درمانی در نظر گرفته شود. مهار miRNAs برای درمان سرطان در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۲۸-۲۹). LNA یک تکنیک برای خاموش کردن miRNAهایی می‌باشد که به عنوان انکوژن عمل می‌کنند (۳۰).

### References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(1): 7-30.
2. Dvinge H, Git A, Graf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, et al. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* 2013; 497(7449): 378-82.
3. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012; 486(7403): 346-52.
4. Le QJ, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 4(3): 230-41.
5. Buffa FM, Camps C, Winchester L, Snell CE, Gee HE, Sheldon H, et al. microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71(17): 5635-45.
6. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490(7418): 61-70.
7. Lyng MB, Laenholm AV, Sokilde R, Gravgaard KH, Litman T, Ditzel HJ. Global microRNA expression profiling of high-risk ER+ breast cancers from patients receiving adjuvant tamoxifen monotherapy: a DBCG study. *PLoS One* 2012; 7(5): e36170.
8. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7065-70.
9. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27(34): 5848-56.
10. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008; 14(11): 2348-60.
11. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117(1): 131-40.
12. Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 2007; 282(2): 1479-86.

13. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Di LG, Merlo A, Triulzi T, et al. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69(6): 2195-200.
14. Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Waddell N, et al. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA* 2013; 19(2): 230-42.
15. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, et al. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol* 2008; 9(8): R127.
16. Cho WC, Chow AS, Au JS. Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *Eur J Cancer* 2009; 45(12): 2197-206.
17. Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, Christian M, Ho KK, Fusi L, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer Res* 2010; 70(1): 367-77.
18. Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, et al. MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer. *PLoS One* 2013; 8(1): e55502.
19. Liu Z, Liu J, Segura MF, Shao C, Lee P, Gong Y, et al. MiR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Pathol* 2012; 228(2): 204-15.
20. Lei R, Tang J, Zhuang X, Deng R, Li G, Yu J, et al. Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis. *Oncogene* 2014; 33(10): 1287-96.
21. Liu H, Wang Y, Li X, Zhang YJ, Li J, Zheng YQ, et al. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1. *Tumour Biol* 2013; 34(3): 1713-22.
22. Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2009; 284(35): 23204-16.
23. Parr C, Jiang WG. Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and anti-metastatic properties in breast cancer. *Eur J Cancer* 2009; 45(9): 1673-83.
24. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 2007; 6(13): 1586-93.
25. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 2009; 460(7254): 529-33.
26. Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(6): 1814-9.
27. Li AY, Boo LM, Wang SY, Lin HH, Wang CC, Yen Y, et al. Suppression of nonhomologous end joining repair by overexpression of HMGA2. *Cancer Res* 2009; 69(14): 5699-706.
28. Stoffel M, Poy MN, Tuschl TH. MicroRNA and methods for inhibiting same. Publication No. US7365058 B2 [Patents]. 2008.
29. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4(3): 143-59.
30. Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* 2006; 372: 137-41.

## Inducing Apoptosis and Decreases Cell Proliferation in Human Breast Cancer Cells through miR-182-5p Blockage Caused by Locked Nucleic Acid

Mohammadreza Sharifi<sup>1</sup>, Abbas Moridnia<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** MicroRNAs (miRNAs) are single strand and short non-coding RNAs involved in post-transcription expression of genes. MiRNAs exhibited a substantial role in numerous cellular processes including cell proliferation, differentiation, cell cycle, apoptosis, and cancer development by negative regulation of tumor suppressor or oncogenic genes. Breast cancer is one of the most common cancers in world. Several studies reveal that miR-182-5p is up-regulated in breast cancer.

**Methods:** MiR-182-5p blockage was performed using locked nucleic acid (LNA) technology in human breast cancer cell line (MCF-7). After blockage, miR-182-5p expression, cell proliferation, apoptosis and necrosis were measured. MiR-182-5p expression was assessed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) at 24, 48, and 72 hour after locked nucleic acid anti-miR-182-5p transfection. Moreover, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and annexin/propidium iodide staining were evaluated.

**Findings:** MiR-182-5p expression decreased at 24, 48, and 72 hours after transfection in the locked nucleic acid group compared to control groups. Cell viability was statistically different between locked nucleic acid and control groups. In the locked nucleic acid group, due to miR-182-5p inhibition, apoptosis ratio increased more than the other groups. Similarly, necrosis ratio in the locked nucleic acid group increased more than the other groups.

**Conclusion:** In this study, miR-182-5p blockage reduced cell viability in MCF-7 cells chiefly due to induction of apoptosis and necrosis. Our results can help translational medicine for investigation on antisense therapy in human breast cancer.

**Keywords:** Cell proliferation, Apoptosis, Breast neoplasms

**Citation:** Sharifi M, Moridnia A. **Inducing Apoptosis and Decreases Cell Proliferation in Human Breast Cancer Cells through miR-182-5p Blockage Caused by Locked Nucleic Acid.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(418): 57-63.

1- Assistant Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- PhD Student, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Abbas Moridnia, Email: a\_moridnia@med.mui.ac.ir