ORIGINAL ARTICLE

Effects of Silencing of Humanin on Cell Fate and Tumor Cell Responses to Etoposide in AGS Cell Line

Mohammad Shokrzadeh[1],
Javaneh Charkhtab Moghaddam[2],
Nafiseh Nasri Nasrabadi[3],
Mojtaba Najafi[4]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Doctorate of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Ramsar International Unit, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran
[3] PhD Student in Toxicology-pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran,Iran
[4] PhD in Animal Breeding and Genetics, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari,Iran

(Received November 22, 2016 Accepted November 26, 2017)

Abstract

Background and purpose: Humanin is a 24-aa peptide that is considered as one of the probable players of autophagy. Its inevitable role in the inhibition of apoptosis in cells is revealed, but its probable importance in autophagy is under evaluation. This study evaluated the role of humanin protein in induction of autophagy and efficacy of chemotherapy drug etoposide.

Materials and methods: HN3 gene was synthesized and cloned in pcDNA3.1 vector and electroporated in AGS cell line. Expression analysis in AGS cell line was done by SDS-PAGE and Real-time PCR using specific primers. HN3 gene inhibition was done using specific siRNA molecules. siRNAs transfection to the recombinant AGS cell line was done using Lipofectamine. The effects of the humanin inhibition on efficacy of chemotherapy agents was studied using Real-time PCR and MTT assay.

Results: Our data showed that dose of 100 nm of siRNA caused about 40% increase in the mortality of cancer cells.

Conclusion: To the best of our knowledge the current research was the first on the role of humanin gene in induction of autophagy in stressful cancer cells that evaluated its exact mechanism in autophagy induction. In addition, HN3 inhibition could increase the efficacy of chemotherapy agents in cancer cells.

Keywords: stomach cancer, autophagy, humanin, etoposide, SiRNA

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (156): 1- 19 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۶ دی سال ۱۳۹۶ (۱۹-۱)

مهار ژن هومانین جهت بررسی اثرات آن در اثر بخشی داروی Etoposide در رده سلولی سرطان معده

محمدشکرزاده[۱]
جوانه چرختاب مقدم[۲]
نفیسه نصری نصرآبادی[۳]
مجتبی نجفی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: هومانین یک پپتید ۲۴ آمینواسیدی می‌باشد که به عنوان فاکتور ایفاکننده‌ی نقش اتوفاژی در نظر گرفته می‌شود. نقش بدیهی آن در مهار آپوپتوز در سلول‌ها مشخص شده است، اما اهمیت آن در اتوفاژی در حال بررسی است. در این مطالعه به بررسی نقش پروتئین هومانین در القاء اتوفاژی و اثر دهی داروی شیمی درمانی اتوپوزاید پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهت سنتز و کلون کردن این ژن از وکتور pcDNA3.1 استفاده گردید. با روش الکتروپوریشن وارد رده سلولی AGS شد. میزان بیان به وسیله‌ی روش‌های SDS-PAGE و Real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در رده‌ی سلولی AGS ارزیابی شد. جهت مهار این ژن از مولکول‌های siRNA اختصاصی استفاده گردید. جهت وارد کردن siRNA به رده سلولی AGS نو ترکیب از لیپوفکتامین استفاده شد و اثرات مهار هومانین بر کارآیی عوامل شیمی درمانی با استفاده از آزمون‌های Real-time PCR و Assay MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با توجه به نتایج داده‌های این مطالعه، دوز ۱۰۰ نانو مول از siRNA حدود ۴۰ درصد، باعث افزایش مرگ و میر سلول‌های سرطانی شد ($p<۰/۰۵$).

استنتاج: این مطالعه، مطالعه ای اولیه در مورد نقش ژن هومانین در القای autophagy در سلول‌های سرطانی بوده است و به طور دقیق مکانیسم آن در القاء autophagy مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشاهده شد، مهار HN3 می‌تواند اثر عوامل شیمی درمانی در سلول‌های سرطانی را افزایش دهد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، اتوفاژی، ژن هومانین، اتوپوزاید، siRNA

مقدمه

سومین علت شایع مرگ و میر وابسته به سرطان، بعد از سرطان ریه و پستان در جهان، سرطان معده می‌باشد (۷۴۰۰۰۰ مورد مرگ در سال). نتایج درمان سرطان معده چندان رضایت بخش نبوده و بیش از ۳۰ درصد از بیماران در زمان تشخیص، در مراحل پیشرفته بیماری هستند که بیش‌تر به کبد، ریه یا استخوان متاستاز داده‌اند. هومانین یک گلیکوپپتید اندروژن است که به تازگی شناسایی شده است و دارای ۲۴ اسید امینه بوده و مربوط به مهار مرگ سلولی می‌باشد. تعداد زیادی از مطالعات در شرایط آزمایشگاهی نشان داده است که هومانین باعث سرکوب آنتی بادی ناشی از مرگ سلول‌های عصبی F11 و PC12 تمایز نیافته سلول‌های

مولف مسئول: نفیسه نصری نصر آبادی– تهران، خیابان ولیعصر، ضلع جنوب غربی تقاطع نایش، مجتمع آموزشی پژوهشی نایش، مرکز تحقیقات علوم دارویی Email: n_nasri2000@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه سم شناسی/فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دکتری داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، واحد بین الملل رامسر، رامسر، ایران
۳. دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۹/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۵/۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۹/۵

فئوکروموسیتوم می‌شود(۱). هومانین (HN) یک پپتید با خاصیت سیتوپروتکتیو است که نخستین بار در سال ۲۰۰۱ توسط گروهی ژاپنی به عنوان یک فاکتور محافظت کننده از نورون که مرگ سلول نورونی القا شده در اثر بیان ژن‌های مرتبط با بیماری آلزایمر فامیلی و تجمع بتا آمیلوئید را ساپرس می‌کند، در مغز فردی مبتلا به بیماری آلزایمر، شناسایی شد(۲). بررسی‌ها نشان داده‌اند که هومانین با غلظت‌های متفاوت می‌تواند یک نقش محافظتی به ویژه در سلول‌های عصبی داشته باشد. از زمان کشف اولیه، مطالعات متعدد نشان داده است که هومانین یک مولکول بقای سلول با دامنه ی وسیع است که می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی مورد توجه قرار گیرد. بیان این پپتید در بیماری آلزایمر، سیستم‌های قلبی- عروقی، عصبی و تولید مثل گزارش شده است(۵ ،۳). علی‌رغم مطالعات بسیاری که در زمینه‌ی منشا DNA هومانین صورت گرفته، هنوز مشخص نیست که دارای منشا میتوکندریایی یا هسته‌ای می‌باشد(۶). بر اساس مطالعات هاشیموتو و همکاران، هومانین ویژگی نوروپروتکشن خود را از طریق فعال‌سازی تیروزین کینازهای خاص، ترادیسنده‌های پیام و فعال‌کننده‌های نسخه برداری (STATs) به خصوص STAT3 اعمال می کند. تیروزین کیناز ها نقش مهمی را در مسیرهای متعدد هدایت پیام ایفا می‌کنند. فعال‌کننده‌های نسخه برداری به عنوان پروتئین‌های سیتوپلاسمی که نقش‌های مهمی در پاسخ‌های نرمال سلولی به سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد ایفا می‌کنند، شناخته می‌شوند. فعالیت غیر نرمال اعضای به خصوصی از خانواده‌ی STATها به ویژه STAT3 در سرطان زایی گزارش شده است(۸). هومانین که قادر به سرکوب مرگ سلولی از هر دو مسیر آپوپتوتیک و غیر آپوپتوتیک است، ممکن است از مسیر آبشار هدایت پیام ضد آپوپتوتیک وابسته به STAT3، نیز با سرطان زایی در ارتباط باشد(۷). شواهدی دال بر اثرات ضد التهابی هومانین نیز به دست آمده است(۹). هم‌چنین مطالعات اخیر نشان می‌دهد که هومانین در تنظیم همئوستاز گلوکز نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند(۱۰). افزایش بیان هومانین در سرطان‌ها می‌تواند مربوط به استرس ایجاد شده در ریز محیط سلول‌های سرطانی مانند کمبود مواد غذایی باشد که سبب تحریک آغاز آپوپتوز می‌گردد و سلول‌های سرطانی با افزایش بیان ژن هومانین به عنوان یک فاکتور آنتی آپوپتوتیک، بر این آپوپتوز فائق می‌آیند. به علاوه، کمبود مواد غذایی و تقسیم مداوم سلولی نیاز به انرژی را افزایش می‌دهد که هومانین با افزایش تولید انرژی در سلول‌های سرطانی سبب از بین رفتن استرس‌های متابولیک می‌گردد. با در نظر گرفتن فعالیت محافظ سلولی و آنتی‌آپوپتوتیک هومانین، در این مطالعه با بیان و مهار این ژن در رده سلولی سرطان معده (AGS)، نقش احتمالی این ژن بر اثر دهی داروهای شیمی درمانی به خصوص Etoposide و نقش این ژن در فعال‌سازی اتوفاژی و مهار آپوپتوز بررسی شد. اتوپوزاید یک مشتق گلیکوزید نیمه سنتتیک از پودوفیلوتوکسین است و از عصاره گیاه mondark به دست می‌آید. در حال حاضر اتوپوزاید به طور گسترده برای درمان انواع متعددی از سرطان‌ها به کار می‌رود و به DNA سلول سرطانی آسیب می‌زند. این آسیب از طریق آپوپتوز بوده و از طریق مهار آزاد سازی ADP از هیدرولیز ATP و با فعال‌سازی مسیرهای اکسید و احیا برای تولید مشتقاتی که به صورت مستقیم به DNA وصل می‌شوند می‌باشد. متابولیت O- demethylated اتوپوزاید تاثیری مشابه داروهای اخیر را دارد و حضور رادیکال‌های آزاد واسطه مثل semi – quinone به شکستن رشته DNA (از طریق شکستن تک رشته DNA) کمک می‌کند. از سوی دیگر اتوپوزاید سوبسترای میلوپراکسیداز است. میلوپراکسیداز آنزیمی است با فعالیت تیروزیناز که اکسیداسیون یک الکترون را به شکل رادیکال فنوکسیل کاتالیز می‌کند. تشکیل رادیکال‌های مطرح شده به خطر ایجاد لوکمی حاد میلوئید نوع ۲ که توسط مصرف طولانی مدت اتوپوزاید ایجاد شده است مرتبط می‌شود. اگر چه تمام

سیگنالینگ‌های مسیرهای واسطه آپوپتوز ناشی از اتوپوزاید مشخص نیست ولی یک مسیر می‌تواند P53 را درگیر کند. از آن‌جایی که آسیب DNA ایجاد شده به وسیله اتوپوزاید، فعال شدن P53 را نشان می‌دهد پس از آسیب DNA، P53 به وسیله تغییرات پس از رونویسی، فعال می‌شود که همانند فسفریلاسیون، د فسفریلاسیون و استیلاسیون است(۱۲، ۱۱). در این مطالعه با توجه به شیوع بالای سرطان معده در کشور، میزان بالای مرگ و میر ناشی از آن، عدم امکان تشخیص زود هنگام این بیماری، اهمیت بررسی ژن‌های دخیل در پاتوژنز این نوع سرطان و به منظور فراهم نمودن اطلاعات بیش‌تر در زمینه‌ی ژن‌های تغییر یافته در سرطان معده که با مکانیسم‌های مولکولی ایجاد کننده‌ی این سرطان در ارتباط اند، به بررسی نقش هومانین در سرطان معده پرداختیم. با انجام مطالعات بر روی سلول‌های AGS که از سلول‌های اپتلیال معده بیمار که مبتلا به آدنوکارسینومای معده بوده است جداسازی شد پس از کشت سلول‌ها و طراحی و ساخت وکتور مورد نظر ژن هومانین را به این سلول‌ها وارد کردیم و توسط دو روش فلوسایتومتری و Realtime-PCR بیان اتوفاژی را مورد بررسی قرار دادیم. توالی ژن هومانین از پایگاه اطلاعات ژنوم NCBI استخراج شد و جهت کلون کردن این پروتئین از توالی mRNA آن به شماره NM_001190472.1استفاده گردید.(جدول شماره ۱). افزایش بیان هومانین در سرطان‌ها می تواند مربوط به استرس ایجاد شده در ریز محیط سلول‌های سرطانی مانند کمبود مواد غذایی باشد که سبب تحریک آغاز آپوپتوز می‌گردد و سلول‌های سرطانی با افزایش بیان ژن هومانین به عنوان یک فاکتور آنتی-آپوپتوتیک، بر این آپوپتوز فائق می‌آیند. به علاوه، کمبود مواد غذایی و تقسیم مداوم سلولی نیاز به انرژی را افزایش می‌دهد که هومانین با افزایش تولید انرژی در سلول‌های سرطانی سبب از بین رفتن استرس‌های متابولیک می‌گردد. با در نظر گرفتن فعالیت محافظ سلولی و آنتی‌آپوپتوتیک هومانین، این مطالعه به بررسی بیان و مهار این ژن در رده سلولی سرطان معده (AGS) و نقش این ژن در فعال‌سازی اتوفاژی و مهار آپوپتوز پرداخته است.

جدول شماره ۱:اطلاعات مربوط به ژن هومانین

نام ژن	کد ژن	Accession Number	نام های دیگر	محل قرارگیری کروموزومی
MTRNR2L3	۱۰۰۴۶۲۹۸۳	NM_001190472.1	HN3	کرموزوم ۲۰

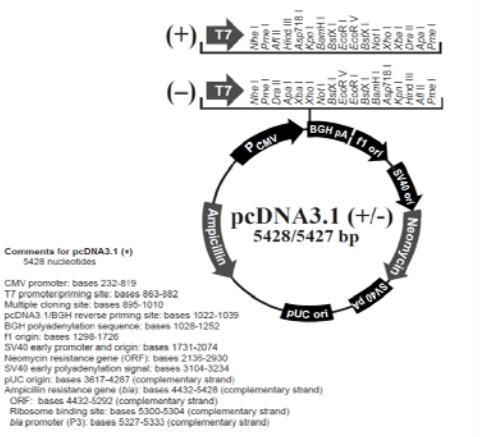
مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، از رده سلولی AGS به شماره CRL-1739 ATCC برای مطالعه ژن هومانین استفاده گردید.(جدول شماره ۲). این رده سلولی با منشا انسانی بوده است. مدل سلولی مناسب جهت بررسی سرطان معده از بافت معده جداسازی گردید و نوع آن چسبنده و از سلول‌های اپی تلیال منشا گرفته است. این رده سلولی از زن ۵۴ ساله با نژادی سفید پوست و مبتلا به سرطان آدنوماکارسینومای معده جداسازی شد.

جدول شماره ۲: مشخصات رده سلولی AGS مورد استفاده به عنوان مدل سرطان معده

کاریو تایپ	به دلیل سرطانی بودن، سلول ها هایپرپلوئیدی(**Hyperploid**) می باشند. عدد کروموزومی آنها برابر با ۴۹ عدد می باشد. جابجایی های کروموزومی **der(8)t(1;8) (q12;p23), der(19)t(19;?)(q13.6;?)** در آن ها مشاهده گردیده است.
منشا تومور	از سرطان آدنوماکارسینومای معده قبل از درمان
مشخصات کشت	تعویض محیط هر ۳ روز یک بار
محیط کشت	**RPMI1640+10% FBS**
زمان دو برابر شدن	۲۰ ساعت

از ابزار ژنتیکی pcDNA™3.1 Vector (بایولب، آمریکا) برای کلون کردن ژن هومانین در رده سلولی AGS استفاده گردید. (تصویر شماره‌ی ۱).برای ورود ژن هومانین به وکتور مورد نظر باید توالی مناسب برای شروع رونویسی، و خاتمه آن را به توالی مورد نظر اضافه نمود. برای اضافه کردن قطعه Kozak از توالی ACCATGG و از توالی TCTAGA برای خاتمه رونویسی استفاده شد که این توالی‌ها در ابتدا و انتهای cDNA ژن هومانین اضافه گردید.



تصویر شماره ۱: نمای کلی وکتور مورد استفاده pcDNA3.1 جهت کلون کردن ژن هومانین

ژن مورد نظر با مقدار مناسبی از وکتور اتصال داده شد و به باکتری E.coli ترانسفورم گردید. برای پیداکردن ترانسفورم‌های دارای وکتور نوترکیب از پلیت‌های حاوی محیط LB (سیناژن- ایران) دارای ۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر از آنتی بیوتیک آمپی سیلین استفاده گردید. وکتور pcDNA3.1 دارای یک ژن مقاومت به آمپی سیلین می‌باشد. بنابراین سلول‌هایی که در فرایند ترانسفورماسیون دارای پلاسمید شده باشند، قادر به رشد در محیط دارای آمپی سیلین هستند. ابتدا باکتری‌های حاوی وکتور pcDNA3.1 در پلیت LB آگار دارای آمپی سیلین، به مدت یک شب انکوبه گردید. بیست عدد از کلنی‌های رشد کرده را به محیط کشتLB ، مایع حاوی آمپی سیلین منتقل کرده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت فوق را به ۵۰ میلی‌لیترLB ، حاوی آمپی سیلین منتقل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده و زمانی که کشت به ۱ واحد از OD600 نانو متر رسید ۴ میلی لیتر از این محیط کشت برداشته شد و وکتور آن خالص‌سازی گردید.جهت ایجاد انتهای چسبنده برای اتصال وکتور و قطعه ساخته شده از ژن هومانین، هر دوی این مولکول‌ها از نقطه ´۵ توسط آنزیم BamHI (فرمنتاز، ایتالیا)و از نقطه ´۳ با آنزیم EcoRI (فرمنتاز، ایتالیا) برش داده شد.(تصویر شماره ی ۲) کلنی‌های که دارای ژن مورد نظر بوده و بر روی محیط کشت رشد نموده بودند با پرایمر های اختصاصی و توسط روش PCR تایید گردیدند. از پرایمرهای اختصاصی وکتور حضور پلاسمیدهای نوترکیب در کلنی‌ها، و از واکنش PCR جهت تایید حضور ژن‌ها استفاده شد.

تصویر شماره ۲: نمایی از قطعه ساخته شده به همراه قطعه کوازک و معرفی محل های برش آنزیم‌های محدود کننده BamHI و EcoRI در دو انتهای قطعه.

برنامه ی دمایی PCR در جدول شماره ۳ آمده است.

جدول شماره ۳: برنامه دمایی PCR

دناتوراسیون اولیه	۹۴ درجه سانتی گراد	۳ دقیقه
	۹۴ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
۳۰ سیکل ازدیاد	۶۸ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
	۷۲ درجه سانتی گراد	۴۵ ثانیه
تکمیل قطعات	۷۲ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه

کلونی‌های تایید شده جهت مشخص شدن نحوه ورود ژن برای توالی یابی ژن‌ها مورداستفاده قرار گرفتند. به منظور آنالیز قطعه‌ی ژن وارد شده با باکتری و شناسایی این ژن استخراج پلاسمید صورت گرفت (مطابق دستورالعمل شرح داده شده در قسمت استخراج پلاسمید pcDNA3.1). پلاسمیدهای حاصل توالی یابی شد. و توالی‌های به دست آمده از فرایند توالی‌یابی، با استفاده از ابزار BLAST، بخش nucleotide blast و الگوریتم‌های blastn و megablast مورد آنالیز قرار گرفت. وکتورهای به دست آمده از کلونی‌های نوترکیب تایید شده با استفاده از روش الکتروپوریشن وارد سلول‌های رده AGS گردید. وکتورهای نوترکیب صحیح به دست آمده از مرحله قبل خالص سازی گردید. جهت وارد کردن وکتور به سلول‌های AGS از روش الکتروپوریشن استفاده شد و DNA توسط آنزیم محدود کننده، خطی گردید. بیان ژن مورد نظر بر اساس روش Real-Time PCR در سلول‌های جانوری تایید گردید. سپس به منظور تایید وجود و اطمینان از صحت RNA استخراج شده، ژل الکتروفورز روی نمونه‌ی RNA انجام گردید. از اسپکتروفوتومتر نوری در طول موج ۲۶۰ نانو متر جهت تعیین مقدار نمونه استفاده گردید و غلظت آن‌ها با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد. هم‌چنین خلوص نمونه با محاسبه‌ی نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. یک واحد جذب RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر، با ۴۴ میکرو گرم در میلی‌لیتر RNA معادل می‌باشد.

(فرمول شماره ۱)

غلظت نمونه (میکروگرم در میلی‌لیتر) = ضریب رقت × جذب خوانده شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر × ۴۴ میکروگرم در میلی‌لیتر

جهت ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده، از آگارز ژل الکتروفورز ۱ درصد با بافر TAE استفاده گردید. در این روش با ارزیابی شدت باندهای S۱۸ و S۲۸ که مربوط به RNA ریبوزومی می‌باشد کیفیت RNA مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌هایی که محتوی RNA به صورت صحیح استخراج شده باشد، شدت باند S۲۸ به S۱۸ به صورت ۲ به ۱ می‌باشد. الکتروفورز با استفاده از بافر TAE (1X)، با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. از کیت سنتز مولکول cDNA با عنوان Expand Reverse Transcriptase (RocheAppleSciences, USA) استفاده گردید. میکس اصلی مواد و آنزیم مطابق جدول شماره ۴ تهیه گردید.

جدول شماره ٤: مواد لازم جهت سنتز cDNA از RNA کل

پرایمر Oligo dT (۱۰ میکرو مولار)	۱ میکرو لیتر
بافر 5X Expand RT	۴ میکرو لیتر
DTT	۲ میکرو لیتر
نوکلئوتید dNTP (۱۰ میلی مولار)	۲ میکرو لیتر
مهارکننده RNase (۴۰ واحد در میکرو لیتر)	۰/۵ میکرو لیتر
آنزیم نسخه بردار معکوس (۵۰ واحد در میکرو لیتر)	۱ میکرو لیتر
آب مقطر استریل	تا حجم ۲۰ میکرو لیتر

در این روش از پرایمرهای oligo dT به عنوان پرایمر جهت ساخت اولین رشته cDNA استفاده گردید. از بیان نسبی ژن هومانین ۳ در بافت سالم و سرطانی جهت تشخیص اتوفاژی در نمونه‌ها به کمک روش Real-Time PCR استفاده گردید.(جدول شماره ۵). پرایمرها به کمک نرم افزار PrimerSelect طراحی و سنتز گردیدند.(جدول شماره ۷). منحنی آنالیز دمای ذوب نیز با افزایش دما از ۶۵ به ۹۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۰/۱ درجه سانتی‌گراد در هر ثانیه بوده است. کارایی واکنش برای ژن‌های مذکور با استفاده از منحنی استاندارد و در نظر گرفتن ۵ نقطه از رقت‌های متوالی ۱ به ۱۰ از غلظت ابتدایی ۱۰۰ نانو گرم از الگو(cDNA) تهیه گردید. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از ژن کنترل بتا اکتین نرمال گردید و بیان نسبی هر یک از ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار REST نسخه ۲،۰،۷ محاسبه شد.

جدول شماره ٥: جدول دمایی تست real time PCR

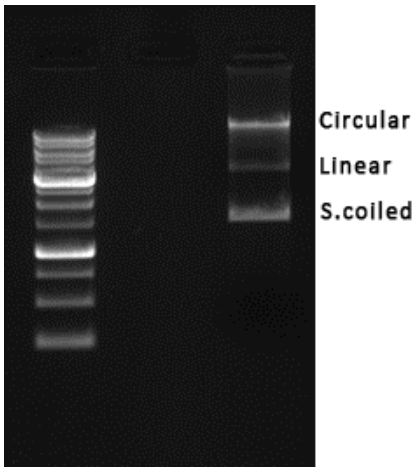
دناتوراسیون اولیه	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه
۴۰ سیکل ازدیاد	۹۵ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه
	دمای اتصال پرایمر ها	۶۰ ثانیه

آنالیز اثر دهی داروی اتوپوزاید به همراه مهار ژن هومانین در سلول‌های AGS به روش MTT Assay این روش براساس تبدیل نمک تترازولیوم به کریستال‌های رنگی فورمازان توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و مقایسه میزان رنگ تولید شده در نمونه‌های مختلف به کمک اندازه‌گیری جذب نوری آن‌ها می‌باشد(۱۳). برای این کار ۵ میلی‌گرم از پودر MTT شرکت Sigma Aldrich را با ترازوی حساس وزن نموده و آن را در ۱ میلی‌لیتر از RPMI 1640 فاقد فنل رد حل گردید. این محلول را با گذراندن از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل کرده و در یخچال نگهداری شد. هنگام کار کردن و اضافه نمودن MTT به چاهک‌ها، محلول استوک آن را باید به نسبت ۱۰:۱ با RPMI 1640 رقیق نمود.

برای انجام مراحل انجام تست MTT Assay، ابتدا پلیت را از انکوباتور بیرون آورده و در زیر هود لامینار بر روی یک سطح شیب دار قرار گرفت. سپس با دقت محیط کشت مربوط به چاهک‌های کنترل و تست را با کمک سمپلر با آرامی کشیده شد. سپس محلول کار MTT Assay را آماده کرده و درون اپندرف ریخته و دور آن با فویل آلومینیومی پوشانده گردید. به هر یک از چاهک‌های کنترل و تست به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول کار MTT اضافه گردید. اطراف پلیت فویل آلومینیومی کشیده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از این زمان ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک افزوده و پس از پیچاندن فویل به مدت ۱۵ دقیقه بر روی روتاتور قرار گرفت. پس از این زمان دستگاه الایزا برای گرفتن جذب در طول موج‌های ۴۵۰ و ۶۳۰ نانو متر تنظیم گردید و پلیت در دستگاه قرار داده شد و جذب آن اندازه‌گیری گردید و توسط پرینتر دستگاه نتایج گزارش شد.

یافته ها

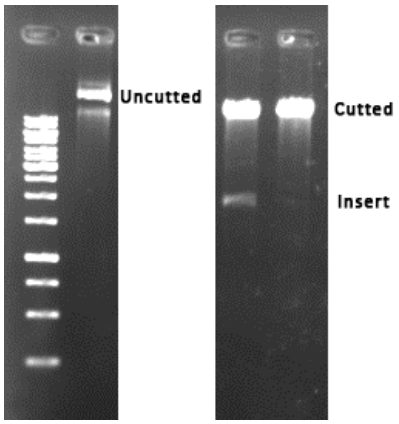
بر اساس فرمول ارائه شده مقدار مناسب از قطعه وارد شده برای وکتور pcDNA3.1، 3/4 نانو گرم محاسبه گردید.(فرمول شماره ۱). میزان وکتور pcDNA3.1 استخراج شده از باکتری E.coli، مورد استفاده ۱۲۵ نانو گرم بر میکرولیتر بوده است که نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانو متر آن ۱/۷۹ محاسبه گردید. در تصویر شماره ۳ وکتور استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شده است که ۳ باند به ترتیب از بالا مربوط به وکتور حلقوی (ممانعت فضایی از حرکت)، نوع خطی (به دلیل ممانعت فضایی کم‌تر، کمی سریع‌تر در ژل حرکت نموده است) و نوع متراکم (که به دلیل پیچ و تاب زیاد و ساختاری کوچک‌تر توانسته در ژل به میزان بیش‌تری پیشروی نماید) را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۳: استخراج وکتور

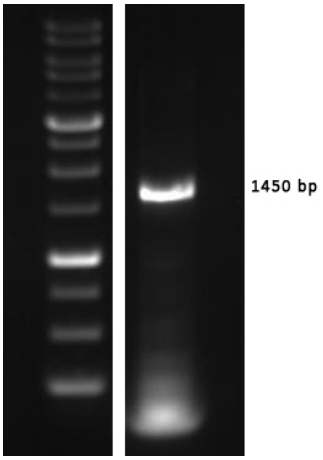
سبرای اطمینان از ورود قطعه ژنی ساخته شده هومانین به وکتور pcDNA3.1 پس از مرحله اتصال مولکول‌ها توسط آنزیم لیگاز، وکتور نوترکیب با آنزیم‌های BamHI و EcoRI برش داده شد. وکتور برش داده شده در مقایسه با وکتور حلقوی به دلیل حذف ممانعت فضایی حالت کروی نسبت به حالت خطی و خارج شدن ژن هومانین بر روی ژل الکتروفورز

۱ درصد، کمی پایین‌تر از فرم بدون برش قرار گرفته است. هم‌چنین قطعه ژن هومانین بعد از برش با دو آنزیم یاد شده از وکتور خارج شد و در نقطه ی طولی متناسب با طول خود بر روی ژل متوقف شده است. تصویرشماره ۴ تایید کننده ساخت موفقیت آمیز وکتور نوترکیب pcDNA3.1و قطعه ژن هومانین می‌باشد.



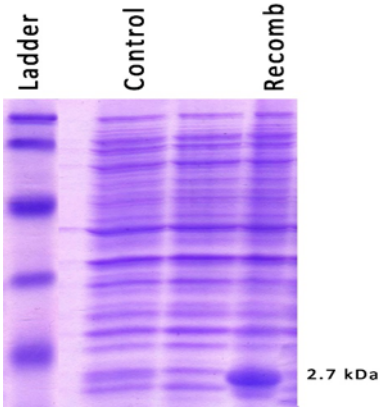
تصویر شماره ٤: برش آنزیمی وکتور نوترکیب pcDNA3.1 و قطعه ساخته شده ژن هومانین

جهت اطمینان از حضور ژن هومانین در باکتری رشد کرده بر روی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین، از پرایمر های اختصاصی وکتور pcDNA3.1 استفاده شد. در این روش در صورتی که وکتور مورد نظر نوترکیب و حاوی ژن هومانین باشد، اندازه محصول PCR بزرگتری نسبت به حالتی که وکتور خالی باشد ایجاد می‌نماید. در تصویر شماره ۵ حضور ژن هومانین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی وکتور pcDNA3.1 نشان داده شده است. محصول PCR به دست آمده از مرحله تایید کلنی‌های مثبت جهت اطمینان از حفظ قالب خوانش و اجزای اضافه شده به قطعه، به همراه وکتور نوترکیب و پرایمرهای اختصاصی آن توالی یابی شد و با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی BioEdit بررسی و پس از حذف نقاط ابتدایی و انتهایی خوانش که کیفیت مطلوبی نداشت. نتایج حاصل از تعیین توالی حاکی از ماهیت قطعه ژن هومانین طی پروسه کلونینگ در وکتور pcDNA3.1 می‌باشد.



تصویر شماره ٥: آنالیز کلنی های مثبت (سفید) با استفاده از روش PCR

از روش سنتی و کیفی ژل پلی اکریل آمید برای حضور ژن هومانین استفاده گردید. در این روش عصاره سلولی مورد نظر پس از تهیه بر روی ژل ۱۵ درصد آکریل آمید بارگذاری شد و تنها در مقایسه با فراکشن های دیگر داخل سلولی که گروه کنترل در این روش می باشند، می توان به طور کیفی حضور و بیان ژن هومانین در سلول‌ها را تایید کرد.(تصویرشماره ۶).



تصویر شماره ٦: آنالیز بیان ژن هومانین در AGS با استفاده از روش SDS-PAGE

برای یافتن منطقه خاموش سازی ژن، از روش پیشنهادی Tuschl استفاده گردید(۱۴). به دلیل وجود اگزون‌ها و اینترون‌ها در توالی ژنومیک، نیازمند استفاده از توالی mRNA ژن که عاری از اینترون ها است، می باشیم. برای استخراج توالی mRNA ژن هومانین، بعد از مراجعه به پایگاه اطلاعات ژنومیک NCBI آمریکا، توالی مربوطه با قالب FASTA ذخیره گردید. سپس طبق الگوریتم siRNA یابی، که جهت یافتن توالی‌های اثر RNAi می باشد نقاط هدف را پیدا گردید و مورد بررسی قرار گرفت. این نقاط، شامل توالی‌های ۱۹ تا ۲۱ نوکلئوتیدی می‌باشند. سپس با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه داده NCBI، نواحی off-target درتوالی‌های مذکور شناسایی و حذف شده و در نهایت، ناحیهٔ مورد نظر روی mRNA انتخاب گردید. جدول(جدول شماره ۶) نتایج حاصل از الگوریتم به کار رفته برای مهار ژن هومانین می‌باشد که از میان توالی‌های فوق، توالی شماره ۱ جهت سنتز به شرکت GenScript ارسال شد.(جدول شماره ۶).

جهت طراحی siRNA کنترل ژن هومانین یا همان Scramble از الگوریتم و نرم افزار شرکت siRNA Wizard v3.1 استفاده گردید و توالی ۵ 'GATCCAAGATACACCGTTAAA 3' به عنوان کنترل پیشنهاد گردید.(جدول شماره ۶).

جهت بررسی میزان کاهش بیان ژن هومانین پس از وارد کردن مولکول‌های siRNA اختصاصی ژن هومانین که باعث تکه تکه شدن مولکول mRNA هومانین می‌گردند، از روش Real-Time PCR با SYBR Green استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها با این روش از پرایمرهای اختصاصی آن که در جدول شماره ی ۷ گردآوری شده است، استفاده گردید. پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار PrimerSelectطراحی و توسط شرکت ژن فناوران سنتز گردید.

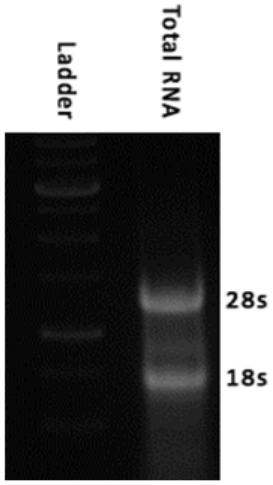
جدول شماره ٦: طراحی مولکول های siRNA جهت مهار ژن هومانین

No.	Sequence	Start	GC%	Scores	ΔE/Thermodynamic
1.	AAGGAACTCAGCAAATCTTAC	621	38.10	22.50	3.08/-31.90
2.	AAGAGGCGGATATAAACAAAT	846	33.33	16.67	8.05/-30.20
3.	AACAGCGCAATCCTATACTAG	1084	42.86	14.45	3.88/-33.90
4.	AACATCACATTGGACTAATCT	408	33.33	8.95	2.04/-31.10
5.	AATTCTAACCAGTCTACTGAA	382	33.33	4.75	0.70/-31.10
6.	AATGGTGTAGCCGCTATTAAG	1157	42.86	4.39	4.78/-33.60
7.	AACCTTATGGAGCTTTAATTC	877	33.33	3.90	2.02/-29.70
8.	AAAGGAACTCAGCAAATCTTA	620	33.33	2.90	3.68/-30.60
9.	AATCCTATACTAGAGTCCATA	1092	33.33	2.25	3.88/-32.20
10.	AAATTGATCTATCCGTGAAGA	829	33.33	2.00	0.53/-30.60

جدول شماره ۷: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.

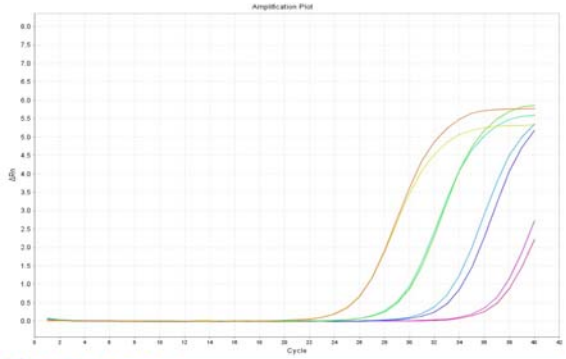
Primer Name	Accession Number	Length	Sequence (5' to 3')	Annealing Temp
CPCR F		20	TAATACGACTCACTATAGGG	60 °C
CPCR R		18	ATCTTCCGTGTCAGCTCC	
HN3-F	NM_001190472.1	20	GGTGATAGCTGGCTGGCTTA	62 °C
HN3-R	NM_001190472.1	20	ATTAGTGGCTGCTTTTGGGC	
ACTB-F	NM_001101.3	21	ATGGCCACGGCTGCTTCCAGC	60 °C
ACTB-R	NM_001101.3	21	CAGGAGGAGCAATGATCTTGA	
LC3-F	NM 002647.2	20	GGCACACAGAGTGAGCAGTA	59.5 °C
LC3-R	NM 002647.2	20	CACAGCCTCTTCATCCGACA	
Beclin1-F	NM_003766.3	20	GCTGAAGACAGAGCGATGGT	59.5 °C
Beclin1-R	NM_003766.3	20	CATGGTGCTGTTGTTGGACG	
ATG12-F	NM_004707.3	20	TGCTGGAGGGGAAGGACTTA	59.5 °C
ATG12-R	NM_004707.3	20	GTTCGCTCTACTGCCCACTT	

جهت اندازه‌گیری بیان ژن هومانین به روش Real-Time PCR در مرحله اول می‌بایست mRNA سلول‌های تحت تاثیر مولکول‌های siRNA استخراج گردد. از روش Trizol جهت استخراج RNA استفاده گردید. در تصویر شماره۷ RNA استخراج شده نشان داده شده است که بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید. باند های ۲۸ sو ۱۸ sکه بر روی ژل نمایان شده است تایید کننده ماهیت RNA استخراج شده می‌باشد. میزان RNA استخراج شده ۸۶۰ نانوگرم بر میکرولیتر بوده و نسبت جذب طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برابر ۱/۷۸ می‌باشد.



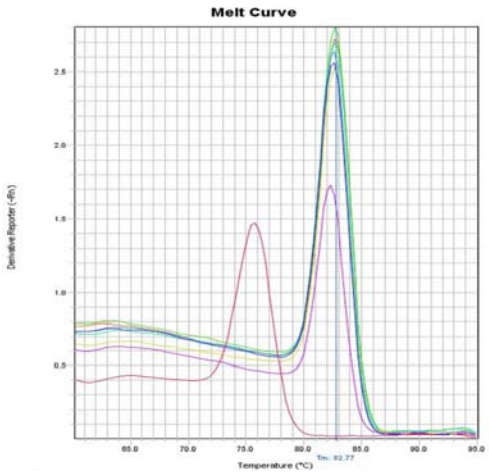
تصویر شماره ۷: mRNA سلول های تحت تاثیر مولکول های siRNA

نمودار شماره ۱، Amplification ژن هومانین با پرایمرهای اختصاصی آن، در حالت استاندارد را نشان می‌دهد که بیانگر افزایش لگاریتمی بیان ژن در نقاط مختلف نمودار، استاندارد می‌باشد. اختلاف ۳/۳ میزان سیکل، در هر ۱۰ برابر کاهش غلظت در نمودار استاندارد، حاکی از ازدیاد قابل قبول توسط پرایمرهای اختصاصی ژن هومانین می‌باشد.



نمودارشماره ۱: نمودار Amplification ژن هومانین با پرایمر های اختصاصی آن

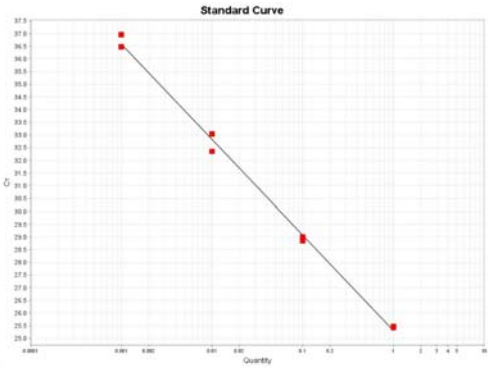
نمودار شماره ۲، Melting Curve ژن هومانین با پرایمرهای اختصاصی آن در حالت استاندارد را نشان می‌دهد که بیان‌گر اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده، عدم ایجاد واکنش‌های جانبی و باند های اضافی حین واکنش PCR می‌باشد. نقطه ذوب یکسان میان غلظت‌های مختلف استاندارد حاکی از ایجاد تنها یک باند اختصاصی با دمای ذوب ۸۲/۷۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و هم‌چنین هیچ‌گونه واکنش پرایمر دایمر ینگ نیز مشاهده نگردید.



نمودارشماره ۲: نمودار Melting Curve ژن هومانین با پرایمر های اختصاصی آن

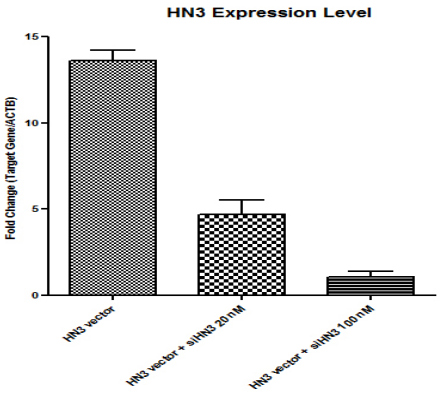
نمودارشماره ۳، استاندارد ژن هومانین با پرایمرهای اختصاصی آن در حالت نمودار استاندارد را نشان

می‌دهد که بیان‌گر اختصاصیت پرایمرهای مورد استفاده و واکنش صحیح و بهینه Real-Time PCR استفاده شده، می‌باشد. قرارگیری غلظت‌های استفاده شده بر روی خط و همبستگی r2=0/98 نشان دهنده واکنش صحیح و دقت تهیه ساخت واکنش‌ها می‌باشد. میزان کارایی واکنش نیز بر اساس شیب خط در حدود ۱۰۰/۶۸ درصد مشخص گردید.



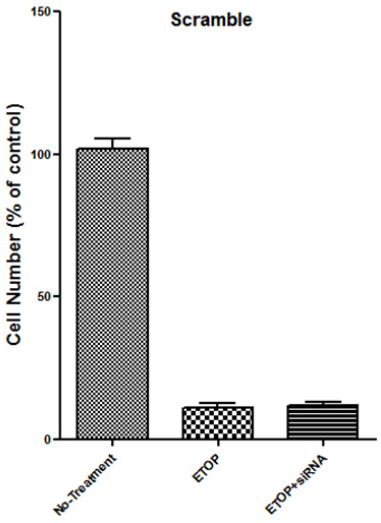
نمودارشماره ۳: نمودار استاندارد ژن هومانین با پرایمر های اختصاصی آن

بیان نسبی ژن هومانین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی وSYBR Green در گروه سلول‌های دارای وکتور نوترکیب ژن هومانین، گروه دریافت کننده ژن هومانین، غلظت ۲۰ نانو مول از siRNA اختصاصی هومانین، گروه دریافت کننده ژن هومانین و غلظت ۱۰۰ نانو مول از siRNA اختصاصی هومانین بررسی شد. میزان بیان ژن در گروه‌های فوق به ترتیب ۱۳/۵۹، ۴/۶۶ و ۱/۰۷۲ مشخص گردید.(نمودارشماره ۴) بیان ژن در گروه‌های فوق در رابطه با گروه کنترل که سلول‌های فاقد وکتور ژن هومانین و هیچ گونه siRNA دریافت نکرده بودند، مقایسه و به صورت میزان چند برابر شدن گزارش گردید. هم‌چنین از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید و رابطه مستقیم، میان غلظت siRNA استفاده شده و میزان مهار بیان ژن هومانین مشاهده گردید.

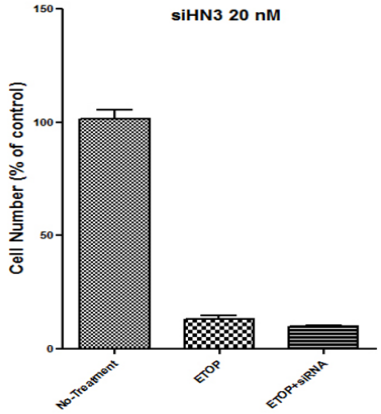


نمودار شماره ٤: بیان نسبی ژن هومانین با استفاده از پرایمر های اختصاصی

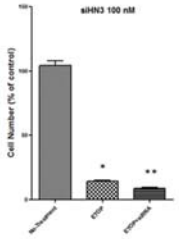
میزان اثر دهی مهار ژن هومانین در سلول‌های AGS بیان کننده ژن هومانین با استفاده از روش MTT، و بیان درصد سلول‌های زنده بررسی گردید.گروه‌های بررسی شامل سه گروه siRNA کنترل، گروه دریافت کننده siRNA 20nM و گروه دریافت کننده siRNA 100 nM می‌باشند .(نمودار شماره ۵،۶،۷). هر یک از گروه‌ها در پلیت‌های جداگانه کاشته و به صورت ۳ تایی و در قالب نمونه بدون تیمار، نمونه دریافت کننده اتوپوزاید و نمونه دریافت کننده اتوپوزاید و siRNA مطالعه شدند. از سلول‌های AGS بدون وکتور هومانین به عنوان کنترل استفاده و تمامی نمونه‌ها از گروه‌های مختلف با آن مقایسه گردیدند. در گروه‌های دریافت کننده ی siRNA در غلظت‌های ۲۰ nM و ۱۰۰ nM اختلاف معناداری در افزایش اثر دهی داروی اتوپوزاید مشاهده گردید. ($p<0.05$)



نمودار شماره ۵: آنالیز اثر دهی داروی اتوپوزاید به همراه مهار ژن هومانین در سلول های AGS به روش MTT(siRNA کنترل)



نمودار شماره ٦: آنالیز اثر دهی داروی اتوپوزاید به همراه مهار ژن هومانین در سلول های AGS به روش MTT (گروه دریافت کننده siRNA 20nM)



نمودار شماره ۷: آنالیز اثر دهی داروی اتوپوزاید به همراه مهار ژن هومانین در سلول های AGS به روش MTT (گروه دریافت کننده siRNA 100 nM)

بحث

یکی از اهداف مطالعات بیان ژن، شناسایی ژن‌های دخیل در شرایط سلامتی و بیماری به منظور آگاهی بیش‌تر از جزئیات بیماری‌ها و بهبود استراتژی‌های تشخیصی، درمانی و پیشگیری می‌باشد. در این مطالعه بر شناسایی یکی از ژن‌های دارای افزایش بیان در سرطان معده، به عنوان شایع‌ترین نوع سرطان در کشور،پرداخته شد. سرطان معده به عنوان چهارمین سرطان شایع و دومین علت مرگِ ناشی از سرطان، در دنیا محسوب می‌گردد. بر اساس آمار وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی ایران، شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در ایران، مربوط به سرطان معده بوده و در این میان کشور ایران در رتبه‌ی نخست جهانی مرگ و میرهای ناشی از انواع سرطان قرار دارد. تاکنون، مطالعاتی در زمینه‌ی تغییرات بیان ژن در سرطان معده صورت گرفته است ولی اطلاعات به دست آمده از این مطالعات برای روشن شدن کامل پاتوژنز مولکولی این سرطان کافی نیست. اهمیت استفاده از هیبریداسیون تفریقی در مطالعه ی بیان ژن در سرطان معده بدان جهت است که این روش قادر به پیدا کردن تفاوت بیان ژن ها در بین گروه‌های تحت مطالعه بوده و لذا منجر به شناسایی ژن‌های دخیل در پاتوژنز مولکولی سرطان، یافتن ژن‌های هدف برای دارو درمانی یا ژن درمانی و یا معرفی مارکرهای سطحی یا ترشحی اختصاصی سرطان معده می گردد. در مطالعات پیشین بیشتر اثرات عملکردی ژن هومانین در نقاط مختلف بدن بررسی و نتایجی مبنی بر اثرات مهار مرگ سلولی و به طبع آن اثرات مثبت و منفی ناشی از آن گزارش شد ولی در این مطالعه با مهار عملکرد ژن هومانین با هدف اندازه‌گیری میزان افزایش مرگ سلولی، بهبود در سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج مشاهده شد که تعداد سلول‌های زنده سرطانی به صورت معنا داری

کاهش یافته است. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها نوعی مرگ سلولی می‌باشد که در آن اجسام آپوپتوتیک تشکیل شده، توسط سلول‌های کناری هضم می‌گردند. مکانیسم‌های پیچیده‌ای در سلول‌ها برای پاسخ در برابر تحریکات آپوپتوزی وجود دارد. یکی از ابتدایی‌ترین اتفاقات سلولی در آپوپتوز، فعال شدن آندونوکلئازها که باعث تکه تکه شدن DNA می‌گردند می‌باشد. از زمان کشف اولیه ژن هومانین، مطالعات متعدد نشان داده است که هومانین یک مولکول بقای سلول[1] با دامنه ی وسیع است که می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی، برای بیماری آلزایمر، سیستم‌های قلبی- عروقی، عصبی و تولید مثل مورد توجه قرار گیرد(۱۸، ۱۵). هدف از این مطالعه بررسی مهار ژن هومانین و تاثیر آن در افزایش اثر داروهای شیمی درمانی در بهبود و درمان علامتی سرطان معده است .cDNA هومانین همراه ORF آن، دارای شباهت ۹۹ درصدی با قطعه‌ای از ژن میتوکندریایی MT-RNR2 کدکننده‌ی زیر واحد s16RNAریبوزومی می‌باشد(۱۹). با این حال، حتی چنین پپتید کوتاه شده ای هم دارای عملکرد کامل در ارتباط با مهار مسیر آپوپتوز با واسطه ی BAX می باشد(۲۰). از طرف دیگر، شواهدی دال بر شباهت ۹۲ تا ۹۵ درصدی نواحی مشخصی در کروموزوم‌های مختلف از جمله ۵، ۱۱ و X با cDNA هومانین وجود دارد و این احتمال مطرح می‌شود که شاید mRNA هومانین تنها با نسخه برداری از DNA ژنومیک هسته‌ای تولید می‌شود(۲۲، ۲۱). با مطالعات بیوانفورماتیک انجام شده، در مجموع ۱۳ لوکوس در ژنوم شناخته شد که به عنوان توالی‌های مختلف پپتیدهای شبه هومانین در نظر گرفته می‌شوند(۲۳). این توالی‌ها، جزء mtDNA های هسته‌ای یا NUMT ها طبقه‌بندی می شوند .NUMT ها قطعاتی از DNA های میتوکندریایی هستند که احتمالا طی فرایندی با واسطه عناصر قابل جابجایی[2] یا تکرار شونده[3] در ژنوم هسته وارد شده اند(۲۴). علی رغم آن NUMT ها به عنوان ژن‌های کاذب[4] در نظر گرفته می‌شوند(۲۵، ۲۴)، بر اساس مطالعات بیوانفورماتیکی و شواهد آزمایشگاهی به دست آمده، برخی از توالی‌های هسته‌ای MT-RNR2L ممکن است ژن‌های دارای عملکرد باشند(۲۳). بر اساس مطالعات انجام شده در مدل انسانی لنفوسیت‌ها، مشخص شد که هومانین سبب افزایش غلظت ATP می‌شود و با افزایش تولید انرژی میتوکندریایی سبب بهبود فعالیت متابولیک و افزایش بقای این سلول‌ها می‌گردد(۲۷، ۲۶). نتایج در این مطالعه نشان می‌دهد که مهار ژن هومانین با کاهش سطحATP، از طریق کاهش پروسه اتوفاژی سلول‌های فرسوده و سرطانی را بیش‌تر به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد. هم‌چنین در مطالعات دیگری که بر روی سلول‌های عضلات صاف سیستم قلبی- عروقی انسانی صورت گرفت، مشخص شد که هومانین سبب محافظت سلول‌ها از اثرات سایتوتوکسیک بتا- آمیلوئید می‌شود بنابراین می‌تواند در پیشگیری از آنژیوپاتی در آلزایمر موثر باشد(۲۸). هومانین خاصیت نوروپروتکتیو[5] داشته و سبب مهار مرگ سلول نورونی و جلوگیری از ایجاد اختلال در عملکرد آن می‌گردد(۲۹،۳۰). در واقع هومانین با افزایش سطح ATP شرایط بهتری را برای زیست سلول‌ها فراهم می‌کند و در شرایط کمبود مواد غذایی و شرایط بحرانی کم‌تر به سمت آپوپتوز و مرگ سلولی خواهد رفت. از این ویژگی با مهار این ژن می‌توان برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده نمود. تحقیقات نشان میدهد که هومانین دارای اثرات آنتی آپوپتوتیک بوده و اثرات آنتی آپوپتوتیک خود را از طریق ایجاد اختلال در فعال‌سازی BAX و سرکوب آپوپتوز وابسته به BAX اعمال می‌کند(۳۰). در حقیقت هومانین با اتصال انتخابی به BAX در سیتوپلاسم، مانع جابجایی BAX از سیتوپلاسم به میتوکندری می‌شود بنابراین

[1] Cell survival molecul
[2] Transposable elements
[3] Repetitive elements
[4] Pseudogenes
[5] Neuroprotective

سبب مهار آپوپتوز می گردد. هم‌چنین این پپتید سبب سرکوب مرگ سلول نورونی ایجاد شده به واسطه‌ی c-Jun N-terminal kinase (JNK) و ASK/JNK می گردد(۳۱). به علاوه هومانین به عنوان یک پپتید سیگنال برای ترشح پروتئین‌ها عمل می کند. هومانین با اتصال به گیرنده-Human Formyl Peptide Receptor Like-1 (FPRL-1)و FPRL2 که گیرنده‌های پروتئین بتا- آمیلوئید نیز می‌باشند، به صورت رقابتی سبب مهار اتصال بتا- آمیلوئید به گیرنده و در نتیجه مهار نوروتوکسیسیتی القا شده توسط بتا- آمیلوئید می گردد(۳۲،۳۴). بنابراین در این مطالعه با مهار عملکرد ژن هومانین والقا توکسیسیته احتمالی توسط بتا- آمیلوئید که باعث مرگ بیش‌تر سلول‌های سرطانی می گردد و با افزایش اثر بخشی داروهای شیمی درمانی به بهبود سرطان معده، کمک گردید. با این حال در مطالعاتی که در سلول‌های عصبی F11 صورت گرفت، مشخص شد که فعالیت هومانین تنها از طریق این گیرنده‌ها صورت نگرفته و احتمالا مکانیسم‌های گوناگونی در بروز عملکرد محافظتی هومانین در سلول‌های مختلف دخیل هستند(۳۵،۳۶). بر اساس مطالعات‌هاشیموتو و همکاران، هومانین، ویژگی نوروپروتکشن خود را از طریق فعال‌سازی تیروزین کینازهای خاص و ترادیسنده‌های پیام و فعال‌کننده‌های نسخه برداری[6] (STATs) به خصوص STAT3 اعمال می کند(۳۷،۷). تیروزین کینازها نقش‌های مهمی را در مسیرهای متعدد هدایت پیام ایفا می کنند .STAT ها به عنوان پروتئین‌های سیتوپلاسمی در نقش‌های مهمی که در پاسخ‌های نرمال سلولی به سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد ایفا می کنند، شناخته می‌شوند. فعالیت غیر نرمال اعضای به خصوصی از خانواده‌ی STAT ها به ویژه STAT3 در سرطان زایی گزارش شده است(۳۸). هومانین مرگ سلولی که در بیماری آلزایمر فامیلی ایجاد می‌شود را مستقل از سمیت ناشی از بتا- آمیلوئید ساپرس می کند(۲۱،۲۲،۳۷). هومانین که قادر به سرکوب مرگ سلولی از هر دو مسیر آپوپتوتیک و غیرآپوپتوتیک است، ممکن است از مسیر آبشار هدایت پیام ضد آپوپتوتیک وابسته به STAT3 ، نیز با سرطان زایی در ارتباط باشد(۳۸،۳۹). شواهدی دال بر اثرات ضد التهابی هومانین نیز به دست آمده است(۴۰). هم‌چنین مطالعات اخیر نشان می‌دهد که هومانین در تنظیم همئوستاز گلوکز نیز نقش مهمی را ایفا می کند(۴۰). اثرات هومانین بر متابولیسم گلوکز با اتصال رقابتی هومانین به insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3)در هیپوتالاموس تنظیم می‌شود. بنابراین هومانین به عنوان یک پپتید مرکزی عامل تنظیم کننده‌ی برداشت گلوکز در عضلات اسکلتی شناخته می‌شود(۴۰). به علاوه اثرات تنظیمی هومانین بر متابولیسم گلوکز در برگیرنده ی اثرات محافظتی هومانین بر سلول‌های بتای پانکراس است. مطالعات نشان می‌دهد که هومانین یک فاکتور بقای قوی برای سلول‌های اندوکرین پانکراس می‌باشد و می‌تواند شروع دیابت را در موش به تاخیر بیاندازد. عملکرد و بقای سلول‌های بتای پانکراس به فاکتورهای مختلف درونی و محیطی وابسته است و آپوپتوز این سلول‌ها در پاتوژنز دیابت نقش مهمی دارد. در مطالعات اخیر، به دلیل این که هومانین با مهار آپوپتوز سبب طولانی‌تر شدن بقای سلول‌های بتا و آزاد سازی انسولین می گردد، هومانین به عنوان یک هدف درمانی برای دیابت مطرح شده است(۴۱،۴۲). اتصال هومانین به IGFBP-3 سبب تغییر در فعالیت زیستی فاکتور رشد شبه انسولین(IGF) ، شامل رشد و بقای سلول می گردد .IGFBP-3 از طریق مسیرهای پروآپتوتیک هدایت پیام، از جمله □-TNF ، □-TGFو P53 دچار افزایش بیان می‌شود .IGFBP-3 با اتصال به IGF-1 سبب مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز می گردد و هومانین با اتصال به IGFBP-3 با افینیتی بالا سبب مهار مرگ سلولی القا شده توسط IGFBP-3 می‌شود(۴۳).

[6] Signal transducers and activators of transcription

مشخص شده است که IGFBP-3 یک پروتئین حامل برای IGF-1 و هومانین در بدن می‌باشد، بنابراین ممکن است IGFBP-3 سطح هومانین را در بدن تنظیم نماید و هومانین تولید شده در بافت‌های محیطی خارج از سیستم عصبی مرکزی به وسیله IGFBP-3 به CNS انتقال داده شود. به همین دلیل است که تصور می‌شود که، IGFBP-3برای هومانین به عنوان یک تنظیم کننده‌ی توزیع و فعالیت اختصاصی بافت عمل کند(۴۳، ۳۷). یک برهم کنش قوی بین هومانین و IGFBP-3 در تنظیم هموستاز سلول زایا در بیضه وجود دارد. مشخص شده است که IGFBP-3 به عنوان یک فاکتور پروآپوپتوتیک و هومانین با فعالیت آنتی آپوپتوتیک خود تنظیم کننده‌های مهمی در آپوپتوز سلول زایای نر می‌باشند. بر اساس مطالعه ی انجام شده در موش، فقدان هورمون در بیضه با افزایش IGFBP-3 سبب القای آپوپتوز در سلول زایا در بیضه می‌گردد. تجویز داخل بیضه‌ای هومانین سبب کاهش این نوع مرگ سلولی در سلول زایا می‌شود. این یافته‌ها حاکی از نقش پر رنگ هومانین در تنظیم اسپرماتوژنز و جلوگیری از عملکرد اشتباه بیضه می‌باشد(۴۴). بر اساس مطالعات صورت گرفته، کلسیم سیتوزولی و cAMP سبب افزایش تولید هومانین می‌گردد که می تواند بیانگر نقش فیزیولوژیک این پپتید در پیشبرد بقای سلول تحت شرایط استرس مانند دژنراسیون نورونی، التهاب یا کمبود انرژی باشد(۱۴، ۲۳). مکانیسم تنظیمی سنتز هومانین نیز هنوز کاملا مشخص نیست. بر اساس مطالعات انجام شده سطح هومانین داخل سلولی توسط Tripartite Motif Protein 11 (TRIM11) تنظیم می‌شود TRIM11 .پروتئینی است که با هومانین واکنش داده و آن را مورد هدف لیگاز E3 قرار می‌دهد و از مسیر تخریب پروتئوزومال سبب تنظیم سطح هومانین می‌گردد(۶، ۳۷). افزایش بیان هومانین در سرطان معده می‌تواند مربوط به استرس ایجاد شده در ریز محیط سلول‌های سرطانی مانند کمبود مواد غذایی باشد که سبب تحریک آغاز آپوپتوز می‌گردد که سلول‌های سرطانی با افزایش بیان ژن هومانین به عنوان یک فاکتور آنتی آپوپتوتیک، بر این آپوپتوز فائق می‌آیند. به علاوه، کمبود مواد غذایی و تقسیم مداوم سلولی نیاز به انرژی را افزایش می‌دهد که هومانین با افزایش تولید انرژی در سلول‌های سرطانی سبب از بین رفتن استرس‌های متابولیک می‌گردد. در این مطالعه این اثر به همراه داروی اتوپوزاید مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که با مهار این ژن اثر داروی ضد سرطان اتوپوزاید افزایش، و تعداد سلول‌های زنده سرطانی کاهش معناداری پیدا کرد. در مجموع با توجه به مطالب مطرح شده پیرامون هومانین گمان می رود که اثرات محافظتی هومانین از سلول، ناشی از اثرات آنتی آپوپتوتیک، اثرات متابولیک (بهبود فعالیت زیستی میتوکندری) و احتمالا اثرات ضد التهابی هومانین بوده است و این کار را از طریق رقابت با پروتئین های حامل هورمون‌ها یا آگونیست‌های رسپتورهای سلولی انجام می‌دهد. به منظور مشخص شدن مکانیسم دقیق عمل، فراهمی زیستی، تنظیم بیان و سرنوشت هومانین اندوژن مطالعات بیشتری مورد نیاز است. در کنار نتایج حاصل از مطالعات گذشته که نشان‌دهنده‌ی فعالیت سیتوپروتکتیو هومانین با طیف عملکردی وسیع، مکانیسم‌های اثر هومانین در سلول‌هایی غیر از نورون ها (مانند سلول‌های جنسی و سلول‌های بتای پانکراس) و اثرات بیولوژیک مهم هومانین) از طریق برهم کنش با IGFBP3 یا (STAT3 می‌باشد، یافته‌های حاصل از این مطالعه شواهدی را در حمایت از نقش احتمالی هومانین (به ویژه ایزوفرم‌های (۱، ۳، ۶، ۱۰) در پاتوژنز سرطان معده فراهم نمود. بنابراین بررسی نقش دقیق هومانین (به خصوص ایزوفرم‌های (۱، ۳، ۶، ۱۰) در پاتوژنز مولکولی سرطان معده، دخالت هومانین در مهاجرت سلول‌ها و متاستاز، قابلیت استفاده به عنوان بیومارکر برای تشخیص یا ارزیابی اثر بخشی داروهای ضد سرطان (به دلیل حضور در خون و سهولت دستیابی به آن در بیماران)،

بررسی توانایی این ژن در ایجاد مقاومت دارویی (با توجه به ویژگی آنتی آپوپتوتیک هومانین) و در نهایت پتانسیل درمانی هومانین، نیازمند انجام مطالعات جامع‌تر می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده مشاهده گردید که بیان نسبی ژن هومانین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و شیمی SYBR Green در گروه سلول‌های دارای وکتور نوترکیب ژن هومانین، گروه دریافت کننده ژن هومانین و غلظت ۲۰ نانو مول از siRNA اختصاصی هومانین، گروه دریافت کننده ژن هومانین و غلظت ۱۰۰ نانو مول از siRNA اختصاصی هومانین، به ترتیب ۱۳/۵۹، ۴/۶۶ و ۱/۰۷۲ است. بیان ژن در گروه‌های فوق در رابطه با گروه کنترل که سلول‌های فاقد وکتور ژن هومانین بوده و هیچ گونه siRNA دریافت نکرده بودند، مقایسه به صورت میزان چند برابر شدن گزارش گردید که رابطه مستقیمی میان غلظت siRNA استفاده شده و میزان مهار بیان ژن هومانین وجود داشت. در این مطالعه میزان اثر دهی مهار ژن هومانین در سلول‌های AGS بیان کننده ژن هومانین با استفاده از روش MTT و بیان درصد سلولهای زنده، بررسی گردید و مشاهده شد که در گروه‌های دریافت کننده‌ی siRNA در غلظت‌های ۲۰ nM و ۱۰۰ nM اختلاف معنی‌داری در افزایش اثردهی داروی اتوپوزاید وجود دارد .($p<۰/۰۵$)

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، مهار مطلوب ژن مورد نظر و در نهایت تاثیر آن روی بهبود اثر بخشی داروی اتوپوزاید به صورت معنی‌دار، با Pvalue کم‌تر از ۰/۰۵ درصد در رده سلول‌های مورد استفاده بود که قدمی نخست جهت استفاده از این تکنولوژی در درمان این سرطان‌ها می‌باشد. با مطالعات بیش‌تر و با رفع عیب‌های کنونی امید است فرمولاسیونی مناسب از این siRNA ها برای کارآزماییهای بالینی تهیه گردد. در این مطالعه مشخص شد که مهار ژن هومانین اثر بخشی دارو اتوپوزاید را بهبود می‌بخشد. بنابراین با انجام مطالعات بیش‌تر می‌توان به کاربردهای درمانی آن توجه نمود.

سپاسگزاری

محققین ازتمامی کسانی که ما را درانجام این کار تحقیقاتی یاری رساندند، نهایت قدردانی وتشکر را دارند.

References

1. Ghavami S, Asoodeh A, Klonisch T, Halayko AJ, Kadkhoda K, Kroczak TJ, et al. Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. J Cell Mol Med. 2008; 12(3):1005-1022.
2. Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. Ann Oncol. 2003; 14 (Suppl 2): ii 31-36.
3. Shah MA, Kelsen DP, Gastric Cancer: a primer on the epidemiology and biology of the disease an overview of the medical management of advanced disease. J Natl Compr Canc Netw. 2010; 8(4):437-447.
4. Mccoll KE. Cancer of the gastric cardia. Best Pract Resclin Gastroentrol. 2006; 20(4): 687-696.
5. Hansen S, Vollset SE, Derakhshan MIT, FifeV, Melby KK, Aase S, et al. Two distinct aetiologies of cardia cancer evidence from premorbid serological markers of gastric atrophy and helicobacterpylori status. Gut. 2007; 56(7):918-925.
6. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, et al . Recent patterns in gastric cancer .a global overview. Int J Cancer. 2009; 125(3):666-673.

7. Hashimoto Y, Niikura T, Chiba T, Tsukamoto E, Kadowaki H, Nishitoh H, et al. The cytoplasmic domain of Alzhimer,s amyloid- βprotein precursor causes sustained apoptosis signal via dimerization. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.2003; 306(3): 889-902.
8. Derakhshan MH, Malekzade HR, Watabe H, Yazdanbod A, Fyfe V, Kazemi A, et al. Combination of gastric atrophy reflux symptoms and histological subtype indicates two distinct aetiologies of gastric cardia cancer . Gut. 2008; 57(3):298-305.
9. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience: Exploring the brain. 3rd ed. 2006.
10. Kandel ER, Schwartz TH, Jessell TM. Principles of neural science. 4th ed. 2000.
11. Jo YS, Park EH, Kim IH, Park SK, Kim H, Kim HT, et al. The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. J Neurosci. 2007; 27(49):13567-13578.
12. Benaki D, Zikos C, Evangelou A, Livaniou E, Vlassi M, Mikros E,et all. Solution structure of Humanin, a peptide against AllZhimers disease- related neurotoxicity. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 329(1):152 -160.
13. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al . Arescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimers disease genes and Abeta. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(11): 6336-6341.
14. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobbl J ,oh YK, et al. Humanin is expressed in human vascular walla and has a cytoprotective effect against oxidized LDL induced oxidative estress. Cariovasc Res. 2010; 88(2):360-366.
15. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature.2001; 411(6836): 494 –498.
16. Rossini L, Hashimoto Y, Suzki H, Kurita M, Gieanfriddo M, Scali C, et al. VSTM2L is a novel secreted antagonist of the nouroprotective peptide Humanin. FASEB J. 2011; 25(6): 1083-2000.
17. Meretti E, Giaannerini V, ROOossini L, Matsuoka M , Trabalzini L, Collodel G. Immunolocalization of humanin in human sperm and testis . Fertile Strile. 2010; 94(7): 2888-2890.
18. Zapala B, Kaczynski L, Kiec-wilk B, Staszel T, Knapp A, Thoresen GH, et al. Humanins, the neuroprotective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti inflammatory properties. Pharmacol Rep. 2010; 62(5): 767-777.
19. Turkson J, Jove R. Stat proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. Oncogene. 2000; 27(19): 6613-6626.
20. Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complexes involving CNTF receptor alpha/ WSX-1/ gp 1300 molbiol cell . Mol Biol Cell. 2009; 20(12):2864-2730.

21. Mazumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, Buettner C, Cobb LJ, Fishman S, et al. Humanin: anovel central regulator of peripheral insulin action. Plus One.2009; 4(7): e 6334.
22. Junqueiras Basic Histology: Text and Atlas, 13th ed, c201.
23. Katzung Pharmacology: Chapter 55. Cancer Chemotherapy, 9th ed. 2003, Section VIII.
24. Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. Histol Histopathol. 2000; 15(2): 637-647.
25. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al . Arescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimers disease genes and Abeta. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98(11): 6336-6341.
26. Zapala B, Kaczynski L, Kiec-wilk B, Staszel T,Knapp A, Thoresen GH, et al. Humanins, the neuroprotective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti inflammatory properties.Pharmacol Rep.2010; 62(5): 767-777.
27. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobbl J, oh YK, et al. Humanin is expressed in human vascular walla and has a cytoprotective effect against oxidized LDL induced oxidative estress. Cariovasc Res. 2010; 88 (2): 360-366.
28. Rossini L, Hashimoto Y, Suzki H, Kurita M, Gieanfriddo M, Scali C, et al. VSTM2L is a novel secreted antagonist of the nouroprotective peptide Humanin. FASEB J. 2011; 25(6): 1083-2000.
29. Meretti E, Giaannerini V, Rossini L, Matsuoka M, Trabalzini L, Collodel G. Immunolocalization of humanin in human sperm and testis . Fertile Strile. 2010; 94(7): 2888-2890.
30. Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, et al. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. Nature. 2003; 423(6938): 456-461.
31. Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, et al. Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 283(2): 460-468.
32. Niikura T, Yamada M, Chiba T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. Characterization of V642I-AbetaPP-induced cytotoxicity in primary neurons. J Neurosci Res. 2004; 77(1): 54-62.
33. Bodzioch M, Lapicka-Bodzioch K, Zapala B, Kamysz W, Kiec-Wilk B, Dembinska-Kiec A. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms. Genomics. 2009; 94(4): 247-256.
34. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Brandon M, Wallace DC. Mitochondrial DNA-like sequences in the nucleus (NUMTs): insights into our African origins and the mechanism of foreign DNA integration. Hum Mutat. 2004; 23(2):125-133.

35. Richly E, Leister D. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. Mol Biol Evol. 2004; 21(6): 1081-1084.
36. Kariya S, Takahashi N, Hirano M, Ueno S. Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. Mol Cell Biochem. 2003; 254 (1-2): 83-89.
37. Kariya S, Hirano M, Furiya Y, Ueno S. Effect of humanin on decreased ATP levels of human lymphocytes harboring A3243G mutant mitochondrial DNA. Neuropeptides. 2005; 39(2): 97-101.
38. Jung SS, Van Nostrand WE. Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Abeta-induced toxicity. J Neurochem. 2003; 84(2): 266-272.
39. Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the receptors for humanin. Mol Neurobiol. 2010; 41(1): 22-28.
40. Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. Mol Biol Cell. 2009; 20(12): 2864-2873.
41. Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M , et al. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. J Neurochem. 2003; 84 (4):864-877.
42. Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P, et al. The neurosurvival factor Humanin inhibits beta-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. Metabolism. 2010; 59(3): 343-9.
43. Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, et al. Amyloid (beta) 42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. J Neurosci. 2001; 21(2):RC123.
44. Ying G, Iribarren P, Zhou Y, GongW, Zhang N, Yu ZX, et al. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor.J Immunol. 2004; 172(11):7078-7085.