SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

Archive of SID

بررسی تاثیر مهار بیان ژن نوکلئوسمین بوسیله siRNA بر مهار رشد و القاء تمایز در رده سلولی NB4 لوسمی پرومیلوسیتیک حاد انسانی

سیّد محمد امین موسوی[۱]، نازیلا مقترن بناب[۲*]، محمد علی حسینپور فیضی[۳]

۱- استادیار،گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳- استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Nazilamoghtaran@gmail.com

چکیده

اهداف: نوکلئوستمین نقش عمده‌ای در کنترل رشد و خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی دارد. در اینجا اثرات سرکوب بیان نوکلئوستمین در رشد، تمایز و مرگ رده سلولی NB4 برای اولین بار بررسی شده است.

روش‌ها: سلول‌های NB4 در حضور غلظت ۲۰۰ nM از NS-siRNA کشت داده شدند. سطح بیان نوکلئوستمین توسط RT-PCR نیمه‌کمی بررسی گردید. مهار رشد و مرگ سلولی به ترتیب با آزمون دفع‌رنگ تریپان بلو و میکروسکوپ فلورسنت و تمایز ازنظر ریخت‌شناسی و بیولوژیکی با استفاده از آزمون‌های رایت-گیمسا و لاتکس بررسی شد.

نتایج: خاموشی بیان این ژن می‌تواند به عنوان یک هدف بالقوه در درمان بیماران APL پیشنهاد شود.

کلید واژه ها: تمایز، siRNA، NB4، مهار رشد، نوکلئوستمین.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد[1](APL) یکی از زیر نوع‌های AML می‌باشد که در اثر جابه‌جایی کروموزومی بین ژن پرومیلوسیتیک لوسمی (PML) در روی کروموزوم ۱۵ و ژن رسپتور آلفا رتینوئیک اسید (RAR) در روی کروموزوم ۱۷ ایجاد می شود و منجر به توقف بلوغ پیش سازهای میلوسیتیکی و تجمع پرومیلوسیت‌های نابالغ در خون و مغز استخوان می شود (۱). با وجود پیشرفت‌های اخیر هنوز درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و به نظر می رسد علت آن مقاومت دارویی و عدم ریشه کنی سلول بنیادی سرطانی باشد. سلول‌های بنیادی سرطانی زیر مجموعه کوچکی از سلول‌های سرطانی هستند و مشابه با سلول‌های بنیادی دارای توانایی خودنوزایی [2]می‌باشند. هر گونه اختلال در پدیده خودنوزایی و عدم کنترل آن در سلول‌های بنیادی در نتیجه اختلال در عملکرد ژن‌هایی که در تنظیم این فرآیند دخیل می‌باشند، منجر به تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و تشکیل تومور می شود. لذا یک روش درمانی برای حذف این سلول‌ها، از کارانداختن خودنوزایی آنهاست (۲). یکی از ژن‌های درگیر در خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی، ژن نوکلئوستمین [3](NS) می‌باشد که توسط تی سای و همکاران در سال ۲۰۰۲ میلادی در سلول‌های بنیادی و برخی رده‌های سلولی سرطانی کشف شد (۳). مطالعات اخیر نشان داده است که NS به عنوان یک مارکر سلول بنیادی محسوب می شود و به میزان بالایی در انواع مختلف سلول‌های بنیادی و نیز برخی رده های سلولی بیان می شود (۹-۴). این خصوصیت نشان دهنده نقش عمده NS در حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی می باشد (۱۰). بدین ترتیب به نظر می رسد مهار عملکردی ژن NS با استفاده از استراتژی [4]RNAi منجر به کاهش توان خودنوزایی سلول های سرطانی گردد. (۱۲-۱۱). در این مطالعه بر آن شدیم تا برای اولین بار اثرات مهار ژن NS به واسطه siRNA را برمیزان رشد و تکثیر، مرگ و تمایز رده سلولیNB4 به عنوان مدل آزمایشگاهی APL، بررسی نماییم.

مواد و روش ها

کشت سلول

رده سلولی NB4 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت RPMI-1640 (Biosera، انگلستان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی[5] (Biosera، انگلستان) و آنتی‌بیوتیک‌های استروپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) (سیناژن، تهران) در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد.

طراحی و سنتز siRNA

اولیگوهای دو رشته ای ۲۱ نوکلئوتیدی siRNA علیه ژن NS با استفاده از برنامه انتخاب siRNA (siRNA TargetFinder) موجود در سایت اینترنتی Ambion http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) علیه واریانت‌های NS-mRNA (NM_014366, NM_206825, NM_206826) انتخاب و توسط شرکت Eurofins MWG Operon به صورت نشان دار با فلورسین در انتهای ′۳ سنتز شد. توالی siRNA سنتز شده برای NS به شرح زیر می باشد:

سنس:

5'-GAACUAAAACAGCAGCAGAdTdT-3'

آنـتی سنس :

5'-UCUGCUGCUGUUUUAGUUCdTdT-3'

تیمار سلول ها با siRNA اختصاصی NS

[1] Acute promyelocytic leukemia

[2] Self renewal

[3] Nucleostemin

[4] RNA interference

[5] Fetal Boviner Seum

www.SID.ir

Archive of SID

در روز تیمار 2×10^5 سلول به ازای هر چاهک ظرف ۲۴ خانه (SPL life science، کره جنوبی) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI حاوی سرم و آنتی بیوتیک کشت داده شدند. در یک تیوپ جداگانه اولیگوهای siRNA با غلظت ۲۰۰ نانو مولار به ازای هر چاهک، به ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول Hiperfect transfection reagent (Qiagen، امریکا) به مخلوط بالا افزوده و ورتکس گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از این مدت، محلول حاصل به چاهک حاوی سلول منتقل شد. بعد از گذشت ۶ ساعت، ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم۱۲ ٪ و آنتی بیوتیک به هر چاهک اضافه شد. در آزمایش RNAi از siRNA طراحی شده ی اختصاصی ژن NS و نیز یک siRNA نامرتبط (IR) برای نرمالیزه کردن آثار غیراختصاصی احتمالی فرایند RNAi استفاده شد.

استخراج RNA و واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR)

استخراج RNA از سلول‌های NB4 تیمار شده با NS-siRNA و سلول‌های کنترل ۴۸ ساعت پس از تیمار با استفاده از محلول RNX-plus (سیناژن، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفته و واکنش RT-PCR انجام گرفت. در این تحقیق، ژن (β2m)[1] به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد شماره دستیابی ژن‌های تحت مطالعه، توالی پرایمرها و طول محصولات PCR در جدول ۱ آورده شده است.

مطالعه ریخت‌شناسی سلول‌های NB4 پس از مهار بیان ژن نوکلئوستمین

تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با siRNA در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده، توسط میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus ، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی رشد و زیستایی[2] سلولی

برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته برای تکثیر ژن β2m و نوکلئوستمین.

آغازگر β2m (NM004048) : قطعه حاصل از PCR ۱۹۱ جفت باز می باشد.
آغازگر جلویی 5'- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3´
آغازگر برگشتی 5'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3´
آغازگر نوکلئوستمین (NM014366, NM206825, NM206826): قطعه حاصل از PCR ۴۱۸ جفت باز می باشد.
آغازگر جلویی 5`-AAAGCCATTCGGGTTGGAGT-3`
آغازگر برگشتی 5`-ACCACAGCAGTTTGGCAGCAC-3`

تغییرات ریخت شناسی آپوپتوز

به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (حاوی 5×10^4 سلول) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (Sigma ، امریکا) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و۱۰ میکرولیتر از آن، بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه اسمیر، تغییرات ریخت شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon ، ژاپن) مشاهده گردید (۱۴).

بررسی تغییرات ریخت شناسی تمایز

سلول‌ها، برای فواصل زمانی۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت باsiRNA تیمار شدند و آزمون بلع ذرات لاتکس و رایت-گیمسا انجام و با میکروسکوپ نوری (Olympus ، ژاپن) بررسی شد (۱۳).

نوع مطالعه و تحلیل آماری داده ها

تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه حاصل سه

[1] β2microglobulin
[2] Viability

www.SID.ir

Archive of SID

```
ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: F4S59YF

STACK:
```

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI