Original Article

The Effect of Human Telomerase Reverse Transcriptase Repression on the Increasing Cell Viability and Alterations of Cell Cycle in Gastric Cancer Cell Line

Sogand Vahidi [1], Saba Sorayayi [1], Mohammad Mohammadzadeh [2], S Saied Hosseini-Asl [3,*]

[1] MSc Clinical Biochemistry, Student Research Committee, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran
[2] Research Laboratory of Embryology and Stem Cells, Department of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[3] Digestive Diseases Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

ABSTRACT

Background:
Telomerase is a ribonucleoproteins enzyme responsible for the maintenance of telomere length. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a major component of the catalytic subunit of telomerase enzymes and is expressed in cells that have telomerase activity but is not expressed in normal somatic cells. Based on the specific expression of hTERT in most cancer cells, it can be considered as a factor in the distinction between cancer cells and normal cells. It seems that inhibiting the expression of hTERT has been presented as a therapeutic approach in inhibiting the activity of telomerase. One of the special tools for inhibiting genes is the use of small interfering RNA (siRNAs). The purpose of this study was to investigate the effect of hTERT gene on the cell viability and cell cycle in gastric cancer cells.

Materials and Methods:
In this study, human cancer cells, adenocarcinoma gastric cell line (AGS) were cultured in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute) containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 1% penicillin/streptomycin antibiotics. The suppression of the hTERT gene was accomplished by FlexiTube siRNA. The repression effect of hTERT gene was investigated on cell viability by MTT assay [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] with ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) reader at 570 nm, and cell cycle performed by flow cytometry and DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) staining.

Results:
The effect of hTERT siRNA on the cell viability by MTT assay showed time dependent cell viability of AGS cell line upon treatment and increasing the exposure time to 48 hours for that concentration decreased AGS cell ($p = 0.02$). Analysis of flow cytometry also showed increased number of cells in G1 phase and decreased the number of cells in S phase, and induced apoptosis via decreasing the level of hTERT expression.

Conclusion:
The significant downregulation in hTERT mRNA after 48 hours of hTERT siRNA treatment inhibited the cell viability of AGS cells and cell cycle arrest.

Keywords: Cancer cell line, Gastric cancer, hTERT, Cell viability, Cell cycle

please cite this paper as:
Vahidi S, Sorayayi S, Mohammadzadeh M, Hosseini-Asl SS. The Effect of Human Telomerase Reverse Transcriptase Repression on the Increasing Cell Viability and Alterations of Cell Cycle in Gastric Cancer Cell Line. *Govaresh* 2018;23:152-158.

Corresponding author:
S Saied Hosseini-Asl
Digestive Diseases Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Varzesh sq., Ardabil, Iran
Tel: + 98 45 33256633
Fax: + 98 45 33256644
E-mail: Saied.hosseiniasl@gmail.com

Received: 07 Apr. 2018
Edited: 11 Aug. 2018
Accepted: 12 Aug. 2018

مقاله پژوهشی

تأثیر سرکوب ژن تلومراز ترانس کریپتاز معکوس بر کاهش بقاء و تغییرات چرخه سلولی سرطان معده

سوگند وحیدی[۱]، صبا ثریایی[۱]، محمد محمدزاده[۲]، سید سعید حسینی اصل[۳،*]

[۱] کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
[۲] استادیار هماتولوژی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
[۳] دانشیار ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
تلومراز آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی مسئول حفظ طول تلومر می باشد. تلومراز ترانس کریپتاز معکوس[۱] از اجزای اصلی و زیر واحد کاتالیتیکی آنزیم تلومراز می باشد و در سلول هایی که فعالیت تلومراز دارند بیان می شود اما در سلول های سوماتیک طبیعی قابل سنجش نمی باشد. با توجه به بیان اختصاصی hTERT در اکثر سلول های سرطانی می توان از بیان آن به عنوان یک عامل تمایز بین سلول های سرطانی و سلوهای طبیعی یاد کرد. به نظر می رسد مهار بیان hTERT به عنوان استراتژی درمانی انتخابی در مهار فعالیت تلومراز مطرح باشد. یکی از ابزار های اختصاصی مهار ژن ها استفاده از RNA های دو رشته ای کوچک (siRNA) می باشد.
هدف: هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر سرکوب ژن hTERT بر بقای سلولی و چرخه سلولی سرطان معده می باشد.

روش بررسی:
در این مطالعه از رده سلولی سرطان معده انسان[۲] در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین/ استرپتومایسین استفاده شده است. سرکوب ژن hTERT به وسیله FlexiTube siRNA انجام شد. تأثیر سرکوب ژن hTERT بر درصد بقای سلول ها با استفاده از تکنیک MTT توسط الایزا ریدر در ۵۷۰ نانومتر و درصد فاز های سلولی چرخه سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و توسط رنگ آمیزی DAPI مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:
یافته های این مطالعه نشان می دهد که درصد بقای سلولی مستقل از غلظت siRNA و وابسته به زمان می باشد. به طوری که با مقایسه غلظت های ۰/۰۵ µl، ۰/۱ µl و ۰/۱۵ µl از hTERT siRNA تغییر معنی داری در نرخ بقای سلول مشاهده نشد، در حالی که ۴۸ ساعت پس از تیمار، نرخ بقای سلول به طور معنی داری ($p = ۰/۰۲$) در سلول های تیمار شده در هر سه غلظت siRNA در مقایسه با سلول های کنترل پایین تر بود. آنالیز داده های فلوسایتومتری نیز به دلیل افزایش جمعیت سلولی در فاز G1 و کاهش در فاز S در زمان ۳۶ ساعت پس از تیمار در مقایسه با کنترل توقف چرخه سلولی را نشان می دهد.

نتیجه گیری:
کاهش معنی دار بیان hTERT منجر به القای آپوپتوز، کاهش بقا و رشد سلولی و توقف چرخه سلولی می شود.

کلید واژه: سلول سرطانی، سرطان معده، hTERT، درصد بقای سلول، چرخه سلولی
گوارش/ دوره ۲۳، شماره ۳/ پاییز ۱۳۹۷/۱۵۸-۱۵۲

1. hTERT
2. AGS

*نویسنده مسئول: سید سعید حسینی اصل
مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل،
میدان ورزش، اردبیل، ایران
تلفن: ۳۳۲۵۶۶۳۳-۰۴۵
نمابر: ۳۳۲۵۶۶۴۴-۰۴۵
پست الکترونیک: saied.hosseiniasl@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۸
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۷/۵/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۱

زمینه و هدف:

سرطان معده چهارمین سرطان شایع در جهان و دومین علت مرگ و میر مرتبط با سرطان می باشد.(۱) بالاترین میزان بروز سرطان معده در شرق آسیا گزارش شده است. سرطان معده در نتیجه عوامل محیطی شامل رژیم غذایی، عفونت، فاکتورهای ژنتیک و اپی ژنتیک ایجاد می شود. عوامل اپی ژنتیکی نقش مهمی در پیشرفت و گسترش سرطان دارد. با وجود مطالعات بسیاری که در سال های گذشته انجام شد مکانیسم مولکولی سرطان معده هنوز مشخص نمی باشد.(۲و۳)

تلومرها ساختارهای نوکلئوپروتئینی حاوی تکرار پشت سرهم توالی TTAGGG در دو انتهای کروموزوم های خطی می باشند که در سال

۱۹۳۰ شناسایی شدند. تلومر ها از انتهای کروموزوم در مقابل آسیب و تخریب دو رشته DNA محافظت می کنند و منجر به پایداری کروموزوم می شوند. عملکرد تلومر به سه عامل DNA تلومری، مجموعه پروتئینی شلترین[1] و آنزیم تلومراز وابسته است.(۴و۵) DNA تلومری از توالی تکراری نوکلئوتید های TTAGGG غنی از G و مجموعه پروتئینی شلترین تشکیل شده است. مجموعه شلترین متشکل از شش زیر واحد پروتئینی TRF1[2]، TRF2[3]، RAP1[4]، TIN2[5]، TPP1[6] و POT1[7] می باشد که با تشکیل ساختار های T-loop ایجاد شده در اثر تاخوردگی انتهای '۳ تلومر در حفظ ساختار و طول تلومر و همچنین محافظت از انتهای کروموزوم نقش دارد.(۵-۷) در انسان طول تلومر در محدوده ۱۰ تا ۱۵ کیلو باز قرار دارد که در طی هر تقسیم سلولی طول آن در حدود ۵۰ تا ۲۰۰ جفت باز کوتاه می شود.(۸و۹) با کوتاه شدن طول تلومر برخی از عملکردهای حفاظتی آن از بین می رود. تاکنون دو مکانیسم جهت جلوگیری از کوتاه شدن طول تلومر شناسایی شده است که شامل آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی تلومراز و مکانیسم چند شکلی طولی جایگزینی[8] می باشد. آنزیم تلومراز با افزودن تکرارهای تلومری به انتهای تلومرها در ۸۵ تا ۹۰ درصد سرطان های انسانی از جمله سرطان معده باعث افزایش طول تلومر می شود. چند شکلی طولی جایگزینی دومین مکانیسم نگه دارنده طول تلومر[9] است که در ۱۰ تا ۱۵ درصد سرطان های انسانی دیده شده است.(۶و۱۰) طول تلومر در سلول های یوکاریوتی به عنوان ساعت میتوزی عمل می کند. به طوری که، کوتاه شدن شدید طول تلومرها باعث ورود سلول به مرحله پیری و در نهایت آپوپتوز می شود، درصورت ادامه تکثیر سلولی و عدم وقوع مرگ سلولی ناپایداری ژنومی و ناهنجاری های کروموزومی ایجاد می شود.(۱۱) در سلول های سوماتیک به دلیل عدم حضور تلومراز کوتاه شدن طول تلومر جبران نمی شود. کوتاه شدن طول تلومرها در سلول های سرطانی ممکن است منجر به فعال سازی تلومراز شود. آنزیم ریبونوکلئوپروتئینی تلومراز عامل کلیدی در حفظ طول تلومر (۱۲) و شامل دو زیر واحد hTR[10] یا hTERC و hTERT[11] می باشد. بخش hTR به عنوان الگو RNA در سلول های نرمال و سرطانی حضور دارد، درصورتی که hTERT نقش آنزیمی دارد و تنها در سلول هایی که فعالیت تلومراز دارند بیان می شود و نقش مهمی در فعال سازی تلومراز دارد.(۱۳و۱۴) ژن hTERT در بازوی کوتاه کروموزوم ۵ (5p15.33) و در فاصله ۱/۲ مگاباز (Mb) از تلومر قرار دارد، دارای ۱۶ اگزون و ۱۵ اینترون می باشد. حفظ طول تلومر توسط تلومراز از طریق فرآیند چند مرحله ای شامل حمل پروتئین hTERT و انتقال آن به هسته، مونتاژ قطعات hTR و hTERT در هسته و به کارگیری تلومرها در زمان مناسب طی همانند سازی DNA انجام می شود.(۱۵) بیان بالای hTERT در سلول های سرطانی و تومور های بدخیم گزارش شده است اما در بافت های طبیعی و سلول هایی که فعالیت آنزیم تلومراز ندارند بیان نمی شود.(۱۶) hTERT علاوه بر حفظ طول تلومر با ویژگی های تحرک، تهاجمی و ضد آپوپتوزی خود در سلول های سرطانی نقش کلیدی در پیشرفت تومور دارد.(۱۷و۱۸) بیان hTERT با رشد نامحدود سلول های سرطانی معده در ارتباط است.(۲و۳) افزایش بیان hTERT منجر به افزایش فعالیت آنزیم تلومراز و تومورزایی می شود.(۱۹) پروتئین hTERT انسان شامل چهار منطقه اصلی N-DAT[12]، TRBD[13]، RT[14] و C-DAT[15] می باشد.(۲۰)

در میان تمامی عواملی که در ایجاد و بقای سلول های سرطان معده نقش دارند پاسخ به آسیب DNA[16] در تنظیم فازهای G1، S، G2/M چرخه سلولی نقش مهمی ایفا می کند. تکثیر و سرعت رشد سلولی نرمال به تنظیم دقیق چرخه سلولی وابسته است. اکثر آنکوژن ها و ژنهای سرکوبگر تومور علاوه بر تنظیم رشد و تکثیر سلولی از طریق پیشرفت چرخه سلولی در پاتوژنز تومور تأثیر می گذارند.(۲۱) با توقف آپوپتوز و تسریع چرخه سلولی و تکثیر سلولی، رشد سلول ها به طور غیر طبیعی افزایش یافته و منجر به تومورزایی می شود. تنظیم چرخه سلولی در تقسیم، تکثیر، تمایز، پیری و هموستاز نقش دارد. بی نظمی در فرآیند چرخه سلولی منجر به ترویج بدخیمی و اختلال در پایداری ژن ها و کروموزوم های مرتبط می شود و در نتیجه باعث تسریع در فرآیند تومورزایی می شود.(۲۲)

مهار بیان hTERT باعث مهار فعالیت تلومرازی، کاهش رشد سلولی، مهار تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی و القای مرگ سلول های سرطانی می شود که یک هدف امیدوارکننده در درمان تومورهای بدخیم می باشد. RNA ی کوچک مداخله کننده (siRNA) مشابه mRNA ژن هدف در مرحله پس از رونویسی به عنوان یک ابزار قدرتمند در سرکوب ژن hTERT مؤثر است.(۲۳)

با توجه به نقش حیاتی hTERT و تأثیر سرکوب آن در مهار سرطان، در این مطالعه سرکوب ژن hTERT توسط siRNA انجام شد. علاوه بر آن درصد بقای سلول و مرگ سلولی در طی چرخه سلول مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

کشت سلولی:

رده سلولی آدنوکارسینومای معده انسان (AGS) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در فلاسک ۲۵ سانتی متر مربعی در محیط کشت کامل RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین/ استرپتومایسین کشت داده شد و تحت شرایط کشت سلول در انکوباتور CO2 ۵ درصد و دمای ۳۷ °C نگهداری شد.

1. Shelterin
2. Telomeric repeat binding factor-1
3. Telomeric repeat binding factor-2
4. Repressor/ activator protein-1
5. TRF1-interacting protein-2
6. TINT1/PIP1/PTOP 1
7. Protection of telomeres-1
8. Alternative lengthening of telomeres (ALT)
9. The telomere maintenance mechanism (TMM)
10. Human telomerase RNA
11. Human telomerase reverse transcriptase
12. N-terminal
13. Telomerase RNA binding domain
14. Reverse transcriptase domain
15. C-terminal
16. DDR

سرکوب ژن hTERT:

سرکوب ژن hTERT با استفاده از Hs_TERT_1 FlexiTube siRNA (Qiagen, cat.no SI00049203) مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. پس از شمارش و چند ساعت قبل از ترانسفکشن، سلول های مورد نظر جهت بررسی بقای سلولی و تکنیک MTT در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند، به طوری که در هر خانه ۲×۱۰^{۴} سلول به همراه ۱۵۰ µl محیط کشت کامل حاوی سرم و آنتی بیوتیک قرار داده شد. سپس، سه غلظت ۰/۰۵ µl، ۰/۱ µl و ۰/۱۵ µl از hTERT siRNA در ۵۰ µl محیط کشت فاقد سرم و آنتی بیوتیک را به همراه HiPerFect Transfection Reagent 1 µl مخلوط و جهت تشکیل کمپلکس به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۱۵ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. از مخلوط کمپلکس تشکیل شده به سلول های داخل پلیت اضافه شد و جهت بررسی پس از زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت شرایط رشد سلول انکوبه شد. جهت بررسی تکنیک فلوسایتومتری ۵۲×۱۰^{۴} سلول ها در ۲۳۰۰ µl محیط کشت کامل حاوی سرم و آنتی بیوتیک در پلیت ۶ خانه کشت داده شد و چند ساعت بعد کمپلکس حاوی ۳۷/۵ ng از hTERT siRNA به همراه مخلوط ۴۰۰ µl محیط کشت فاقد سرم و آنتی بیوتیک و ۱۲ µl HiPerFect Transfection Reagent به سلول افزوده شد و جهت آنالیز های فلوسایتومتری برای مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت تحت انکوباسیون قرار گرفت. سلول های کنترل در این مطالعه تنها به وسیله ی HiPerFect Transfection Reagent تحت تیمار قرار گرفتند.

بررسی بقای سلولی با استفاده از تکنیک MTT

سلول های تیمار شده پس از گذشت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت جهت بررسی بقای سلولی توسط MTT Cell Proliferation Assay Kit (Dacell) مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا محیط کشت سلول های داخل پلیت با ۱۰۰ µl محیط کشت تازه جایگزین شد. سپس ۱۰ µl از ۱۲ Mm محلول MMT (شامل ۱۵ mg پودر MTT و ۳ µl ۱۶۴۰ RPMI موجود در کیت) به هر خانه پلیت اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C محیط داخل هر خانه خارج شد و به میزان ۴۰ µl MTT solvent به هر خانه اضافه شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. در نهایت، پس از مخلوط کردن نمونه ها جذب نوری با الایزا ریدر در ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد.

بررسی چرخه سلولی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری:

جهت بررسی اثر Hs_TERT_1 FlexiTube siRNA (Qiagen, cat. no SI00049203) سرکوب کننده ژن hTERT در القای مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوز)، سلول های تیمار شده پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت تریپسینه شد و به وسیله PBS دو بار شستشو داده شد. سپس با استفاده از رنگ DAPI (10 µg/ml, Triton X-100 0.1%v/v in PBS) رنگ آمیزی شد. جهت جلوگیری از چسبیدگی سلول ها از فیلتر nylon mesh استفاده شد و در نهایت چرخه سلولی رده تیمار شده و کنترل توسط دستگاه فلوسایتومتری (Partec CyFlow space, Germany) و نرم افزار FCS Express 6 Plus مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری:

تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزارهای FCS Express 6 Plus و SPSS نسخه ۱۸ و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. اختلاف معنی داری به صورت $P < ۰/۰۵$ محاسبه شد و نتایج به صورت mean ± SD (n = ۳) نشان داده شده است.

یافته‌ها:

بررسی تأثیر hTERT siRNA بر سلول های AGS سرطان معده:

با گذشت ۱۲، ۲۴، ۳۶ ساعت پس از تیمار سلول ها توسط hTERT siRNA (شکل ۱- ب، پ، ت) تغییری در مورفولوژی سلول های تیمار شده در مقایسه با سلول های کنترل (شکل ۱- الف) مشاهده نشد. مقدار کمی سمیت سلولی در سلول های تیمار شده مشاهده شد. در حالی که ۴۸ ساعت پس از تیمار (شکل ۱- ث) کاهش قابل توجه بقای سلولی مشاهده شد.

تأثیر hTERT siRNA بر بقای سلولی:

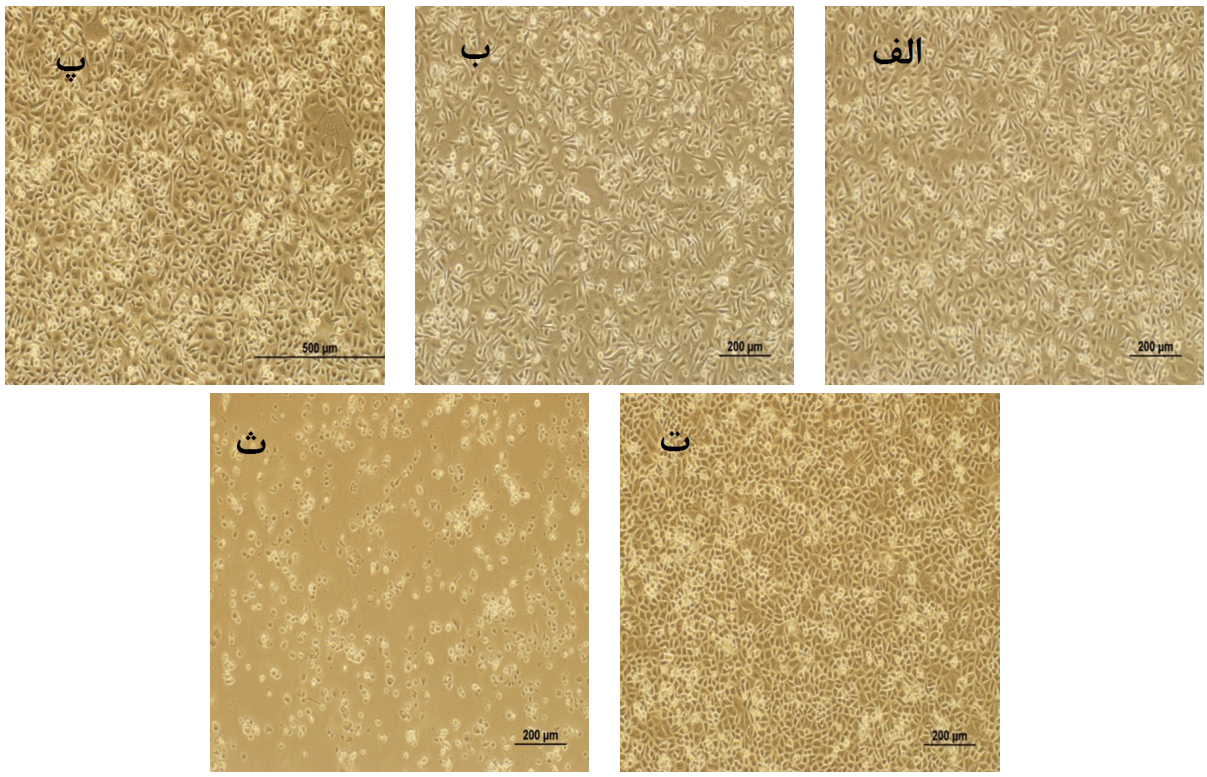
سلول ها با hTERT siRNA مورد تیمار قرار گرفتند و درصد بقای سلولی در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به وسیله تکنیک MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد، درصد بقای سلولی در مقایسه با سلول های کنترل به غلظت hTERT siRNA بستگی ندارد بلکه وابسته به زمان است، به طوری که در غلظت های ۰/۰۵ µl، ۰/۱ µl و ۰/۱۵ µl از hTERT siRNA و پس از گذشت ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تیمار نسبت به سلول های کنترل تغییر قابل ملاحظه ای مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$) اما ۴۸ ساعت پس از تیمار بقای سلولی به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$).

تأثیر hTERT siRNA بر چرخه سلولی:

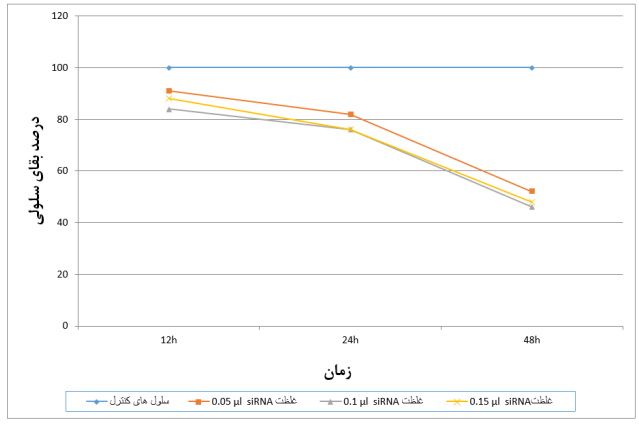
فلوسایتومتری برای بررسی تأثیر hTERT siRNA بر چرخه سلولی AGS پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت انجام شد. نتایج بررسی ها نشان داد تأثیر hTERT siRNA بر روی چرخه سلولی AGS وابسته به زمان می باشد. همانطور که در شکل نشان داده شده است، اگر چه تغییر معنی داری در جمعیت سلولی فازهای G1، S و G2/M ۲۴ ساعت پس از تیمار توسط hTERT siRNA در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد اما درصد جمعیت سلولی ۳۶ ساعت پس از تیمار توسط hTERT siRNA در مقایسه با گروه کنترل در فاز G1 افزایش، در فاز S کاهش و عدم تغییر قابل ملاحظه ای را در فاز G2/M نشان داد. یافته ها نشان می دهد تیمار توسط hTERT siRNA منجر به توقف چرخه سلولی در فاز G1 و مانع از ورود به فاز S چرخه سلولی می شود.

بحث:

RNA مداخله گر کوچک ابزار خوبی جهت سرکوب ژن ها می باشد. مولکول های RNA از جمله siRNA و miRNA از طریق خاموش کردن ژن های مرتبط با سرطان و یا کنترل مسیرهای درگیر در پیشرفت و گسترش سرطان تأثیر بسزایی در درمان برخی بیماری ها به ویژه سرطان دارند. انتخاب ژن مناسب مانند hTERT که تنها در سلول های سرطانی



شکل۱: (الف) سلول های کنترل، (ب) سلول ها پس از ۱۲ ساعت تیمار توسط hTERT siRNA، (پ) سلول ها پس از ۲۴ ساعت تیمار توسط hTERT siRNA، (ت) سلول ها پس از ۳۶ ساعت تیمار توسط hTERT siRNA، (ث) سلول ها پس از ۴۸ ساعت تیمار توسط hTERT siRNA



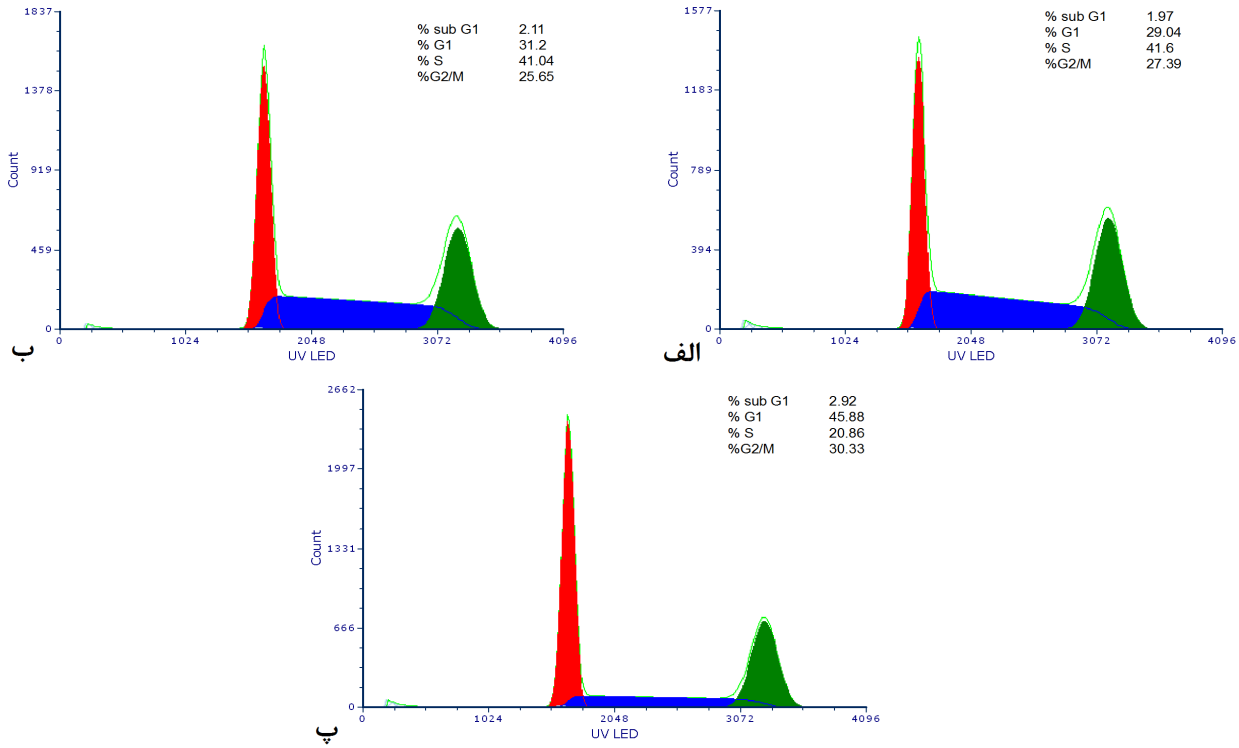
شکل۲: مقایسه تأثیر hTERT siRNA بر بقای سلول AGS در غلظت های ۰/۰۵ µl، ۰/۱ µl و ۰/۱۵ µl از hTERT siRNA و در زمان های ۱۲و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار به وسیله تکنیک MTT

جدول ۱: تأثیر hTERT siRNA بر بقای سلول AGS در زمان های ۱۲و ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار

گروه ها	میانگین ± انحراف استاندارد
غلظت ۰/۰۵ µl hTERT siRNA ۱۲ ساعت پس از تیمار	۹۰/۹ ± ۰/۸
غلظت ۰/۱ µl hTERT siRNA ۱۲ ساعت پس از تیمار	۸۵/۸ ± ۱/۸
غلظت ۰/۱۵ µl hTERT siRNA ۱۲ ساعت پس از تیمار	۸۸/۶ ± ۰/۵
غلظت ۰/۰۵ µl hTERT siRNA ۲۴ ساعت پس از تیمار	۸۱/۴ ± ۰/۷
غلظت ۰/۱ µl hTERT siRNA ۲۴ ساعت پس از تیمار	۷۶/۴ ± ۰/۵
غلظت ۰/۱۵ µl hTERT siRNA ۲۴ ساعت پس از تیمار	۷۵/۸ ± ۰/۴
غلظت ۰/۰۵ µl hTERT siRNA ۴۸ ساعت پس از تیمار	۵۲/۱ ± ۰/۸
غلظت ۰/۱ µl hTERT siRNA ۴۸ ساعت پس از تیمار	۴۶/۹ ± ۰/۷
غلظت ۰/۱۵ µl hTERT siRNA ۴۸ ساعت پس از تیمار	۴۷/۷ ± ۰/۴

بیان می شود اهمیت دارد.(۲۴) مطالعات پیشین نشان می دهد، بیان hTERT برای فعال سازی تلومراز، افزایش سرعت تکثیر و بقای سلول های سرطانی اهمیت دارد، در حالی که مهار بیان ژن hTERT و یا مهار فعالیت تلومرازی منجر به القای آپوپتوز و مهار تکثیر سلولی می شود. بیان ژن hTERT در بسیاری از سرطان ها از جمله سرطان معده بالاست و به همین دلیل می تواند به عنوان مارکری در تشخیص سرطان معده مورد استفاده قرار گیرد. طبق مطالعات گذشته، بیان بالای ژن hTERT در سلول AGS سرطان معده گزارش شده است. بنابراین کاهش قابل ملاحظه بیان ژن hTERT توسط siRNA اختصاصی این ژن منجر به القای آپوپتوز سلول های سرطانی و جلوگیری از رشد و تکثیر سلول ها می شود.(۲۵)

تنظیم غیر طبیعی چرخه سلولی در بیشتر بدخیمی ها منجر به تکثیر سلولی نابجا می شود در حالی که توقف چرخه سلولی و القای



شکل۳: آنالیز چرخه سلولی (الف) سلول های کنترل، (ب) ۲۴ ساعت پس از تیمار توسط hTERT siRNA، (پ) ۳۶ ساعت ساعت پس از تیمار توسط hTERT siRNA. افزایش جمعیت در فاز G1 پس از ۳۶ ساعت نشان دهنده توقف چرخه سلولی می باشد.

جدول ۲: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری در رده سلولی AGS سرطان معده پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار توسط hTERT siRNA؛ داده ها بر پایه میانگین ± انحراف استاندارد گزارش شده است.

سلول ها	G1 (٪)	S (٪)	G2/M (٪)
سلول کنترل	۲۷/۶ ± ۱/۵	۴۰/۸ ± ۰/۸	۲۶/۸ ± ۰/۷
۲۴ ساعت پس از تیمار hTERT siRNA	۳۰/۷ ± ۰/۶	۴۱/۰۱ ± ۱	۲۴/۹ ± ۰/۸
۳۶ ساعت پس از تیمار hTERT siRNA	۴۴/۳ ± ۱/۵	۲۰/۶ ± ۰/۵	۲۹/۸ ± ۰/۶

شکل۴: مقایسه جمعیت سلولی در فازهای G1،S و G2M در سلول های کنترل و تیمار شده توسط hTERT siRNA در زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از تیمار

آپوپتوز در مهار سلول های سرطانی نقش مهمی ایفا می کنند. بر اساس مطالعات گذشته که تأثیر siRNA بر چرخه سلولی BGC-823 و MGC-803 سرطان معده بررسی شد. نتایج افزایش آپوپتوز و همچنین القای توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 و مهار تکثیر سلول سرطان معده را نشان داد. در نتیجه با توقف چرخه سلولی در فاز G1 فرصتی برای تعمیر سلول و یا ورود به مرحله آپوپتوز فراهم می شود.(۲۱و۲۲) در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۱ تأثیر siRNA بر سلول های SGC790 و AGS سرطان معده بررسی شد که مشابه بررسی های انجام شده در این مطالعه مهار تکثیر و توقف چرخه سلولی گزارش شد، به طوری که نتایج کاهش ورود سلول ها از فاز G1 به S را نشان داد.(۲۶)

یافته های حاصل از این مطالعه نشان می دهد، کاهش قابل ملاحظه بیان hTERT، ۴۸ ساعت پس از تیمار توسط hTERT siRNA منجر به کاهش درصد بقای سلولی می شود. در نتیجه جهت بررسی سایر پارامتر ها از جمله بررسی های مولکولی باید زمان کمتر از ۴۸ ساعت انتخاب شود. همچنین افزایش فاز G1 و کاهش فاز S در فلوسایتومتری ۳۶ ساعت پس از تیمار به وسیله hTERT siRNA باعث توقف چرخه سلولی می شود.

REFERENCES:

1. Carcas LP. Gastric cancer review. *J Carcinog* 2014;13:14.
2. Li PF, Chen SC, Xia T, Jiang XM, Shao YF, Xiao BX, et al. Non-coding RNAs and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20:5411-9.
3. Gigek CO, Leal MF, Silva PNO, Lisboa LCF, Lima EM, Calcagno DQ, et al. hTERT methylation and expression in gastric cancer. *Biomarkers* 2009;14:630-6.
4. Wang C, Zhao L, Lu S. Role of TERRA in the regulation of telomere length. *Int J Biol Sci* 2015;11:316-23.
5. Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:175-86.
6. Shay JW. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. *Cancer Discov* 2016;6:584-93.
7. Martínez P, Gómez-López G, García F, Mercken E, Mitchell S, Flores JM, et al. RAP1 protects from obesity through its extratelomeric role regulating gene expression. *Cell Rep* 2013;3:2059-74.
8. Zhao Y, Sfeir AJ, Zou Y, Buseman CM, Chow TT, Shay JW, et al. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell* 2009;138:463-75.
9. Cairney C, Keith W. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 2008;90:13-23.
10. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 2010;11:319-30.
11. Steffens JP, Masi S, D'Aiuto F, Spolidorio LC. Telomere length and its relationship with chronic diseases–New perspectives for periodontal research. *Arch Oral Biol* 2013;58:111-7.
12. Xu Y, Goldkorn A. Telomere and telomerase therapeutics in cancer. *Genes (Basel)* 2016;7.
13. Bär C, Blasco MA. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. F1000Res 2016;5. pii: F1000 Faculty Rev-89.
14. He B, Xiao YF, Tang B, Wu YY, Hu CJ, Xie R, et al. hTERT mediates gastric cancer metastasis partially through the indirect targeting of ITGB1 by microRNA-29a. *Sci Rep* 2016;6:21955.
15. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med* 2016;8:69.
16. Hosseini-Asl S, Atri M, Modarressi MH, Salhab M, Mokbel K, Mehdipour P. The expression of hTR and hTERT in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. *Int Semin Surg Oncol* 2006;3:20.
17. Liu N, Ding D, Hao W, Yang F, Wu X, Wang M, et al. hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 2016;44:8693-703.
18. Chen PC, Peng JR, Huang L, Li WX, Wang WZ, Cui ZQ, et al. Overexpression of human telomerase reverse transcriptase promotes the motility and invasiveness of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep* 2013;30:1157-64.
19. Wang X, Zhou P, Sun X, Zheng J, Wei G, Zhang L, et al. Acidified bile acids increase hTERT expression via c-myc activation in human gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2015;33:3038-44.
20. Ozturk MB, Li Y, Tergaonkar V. Current Insights to Regulation and Role of Telomerase in Human Diseases. *Antioxidants (Basel)* 2017;6.
21. Liu YF, Qu GQ, Lu YM, Kong WM, Liu Y, Chen WX, et al. Silencing of MAP4K4 by short hairpin RNA suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and induces apoptosis in gastric cancer cells. *Mol Med Rep* 2016;13:41-8.
22. Pan X, Yan Y, Li Q, Xu J, Zou Y, Zhou J, et al. Effects of siRNA interference of CDKL1 expression on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Biomed Res* 2017;28:7335-40.
23. Shi YA, Zhao Q, Zhang LH, Du W, Wang XY, He X, et al. Knockdown of hTERT by siRNA inhibits cervical cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2014;45:1216-24.
24. Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference as a plausible anticancer therapeutic tool. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2445-52.
25. Choi YH. Linoleic acid-induced growth inhibition of human gastric epithelial adenocarcinoma AGS cells is associated with down-regulation of prostaglandin E2 synthesis and telomerase activity. *J Cancer Prev* 2014;19:31-8.
26. Wu Q, Gou Y, Wang Q, Jin H, Cui L, Zhang Y, et al. Down-regulation of RPL6 by siRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human gastric cancer cell lines. *PloS One* 2011;6:e26401.