دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
دانشکده پزشکی

پایان نامه دوره دکترای حرفه ای پزشکی

بررسی اثر مهاری anti mir 29a بر بیان ژن های mir29a ، P53 ، P21، BCL2 و Survivin در سلولهای لاین سرطان پستانMCF7

استاد راهنما : دکتر غلامرضا خمیسی پور

استاد مشاور : دکتر بهروز نعیمی

نگارش : الهام منصورآبادی

زمستان ۹۳

بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
دانشکده پزشکی

پایان نامه دوره دکترای حرفه ای پزشکی

بررسی اثر مهاری anti mir 29a بر بیان ژن های mir29a ، P53 ، P21، BCL2و Survivin در سلولهای لاین سرطان پستانMCF7

استاد راهنما : دکتر غلامرضا خمیسی پور

استاد مشاور : دکتر بهروز نعیمی

نگارش : الهام منصورآبادی

زمستان ۹۳

با سپاس وتشکر از

معاونت محترم امور بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

مدیریت محترم امور تحقیقات و اطلاع رسانی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر خمیسی پور

جناب آقای دکتر نعیمی

جناب آقای دکتر طهماسبی

جناب آقای حسن پور

تقدیم به

پدر و مادر و خواهر مهربانم

و

همسر دلسوز و فداکارم

چکیده

اهداف: سرطان پستان شایع ترین سرطان زنان در جهان محسوب می شود. در درمانهای موفق سرطان پستان مقاومت دارویی بعنوان یک مانع بزرگ می باشد. MicroRNA ها نقش مهمی در سرطانزایی و مقاومت دارویی دارند. آنها فرایندهای گوناگونی از جمله تکثیر سلولی و آپوپتوز را تنظیم می کنند .مطالعات اخیر بطور چشمگیری افزایش MicroRNA ها در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان را نشان داده که گویای نقش MicroRNA ها در پاتوژنز این بیماری است . ژن های Bcl2، P53، P21و survivin درتنظیم فرآیند آپوپتوز نقش دارند .P53وP21 در روند آپوپتوز ایفای نقش می کنند در حالی که BCL2 وSurvivin مهار کننده آپوپتوز هستند.

روش کار: سلولهای MCF-7 در محیط RPMI1640 با FBS ۱۰٪ کشت داده شدند .گروههای مورد مطالعه شامل (شاهد و تیمار شده با Scramble، Anti mir-29a ، Anti mir-29a + Taxol ، Taxol) که پس از استخراج total RNA و سنتز cDNA ، تغییرات بیان ژن های P53، P21، Bcl2و Survivin توسط RT PCR بررسی شدند.

نتایج : یافته ها نشان داد مهار microRNA-29a منجر به کاهش بیان Survivin وافزایش بیان P53،Bcl2 شده است درحالی که بر بیان P21 بی تاثیر بوده است.

بحث: نتایج ما نشان داد می توان از مهارکننده های microRNA-29a بعنوان داروی جایگزین تاکسول با اثرات مشابه و عوارض موقتی و کمتر استفاده نمود.

کلید واژه: سرطان پستان ، micro RNA- 29a، Bcl2 ، P53 ، P21 و survivin

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	۱
اهداف	۱
روش کار	۱
کلید واژه	۱
مقدمه	۱۲
فصل اول: کلیات	١٤
۱-۱ سرطان پستان	۱۵
۱-۱-۱ آناتومی پستان :	Error! Bookmark not defined
۱-۱-۲ گسترش سرطان پستا ن	Error! Bookmark not defined
۱-۱-۳ مراحل سرطان پستان	Error! Bookmark not defined

۱-۱-٤ تشخیص سرطان پستان..... ۲۲

۱-۱-۵ مارکرها در سرطان پستان Error! Bookmark not defined.....

۱-۱-٦ درمان سرطان پستان Error! Bookmark not defined.....

۱-۲ سرطان و مکانیسم سلولی و ملکولی آن Error! Bookmark not defined..

۱-۳ تغییرات سلولی سرطان Error! Bookmark not defined.....

اتصال سلول – سلول Error! Bookmark not defined.....

اتصال سلول – ماتریکس خارج سلولی (**ECM**) Error! Bookmark not defined..

۱-۳-۱ سلولهای بنیادی سرطان (**CSCs**) Error! Bookmark not defined..

۱-۳-۲ سلولهای بنیادی سرطان پستان (**BCSC**) Error! Bookmark not defined..

۱-٤ تغییرات ملکولی سرطان و ژن Error! Bookmark not defined..

۱-٤-۱ نقش مولکول های **microRNA** در سرطان زایی و سرطان پستان Error! Bookmark not defined.

عملکرد و ژن Error! Bookmark not defined.....

miRNA ها در سرطان زایی Error! Bookmark not defined.....

microRNA ها و سرطان پستان Error! Bookmark not defined.....

۱-٤-۲ فرایند آپوپتوز وژن هایی که در آن دخیل هستند Error! Bookmark not defined..

ژن **TP53** Error! Bookmark not defined.....

ژن **P21** Error! Bookmark not defined.....

ژن **Survivin** Error! Bookmark not defined.....

ژن **BCL2** Error! Bookmark not defined.....

فصل دوم:بررسی متون..... ٤٥

فصل سوم: مواد و روش ها..... ٥٤

۳-۱- نوع پژوهش Error! Bookmark not defined.....

۳-۲- سلولهای مورد مطالعه Error! Bookmark not defined.....

۳-۳- ژنهای مورد بررسی Error! Bookmark not defined.....

۳-٤- دارو و شبه داروی مصرفی در این تحقیق Error! Bookmark not defined..

۳-٥- ذوب کردن سلول های لاین سرطان پستان **MCF-7** Error! Bookmark not defined..

مواد و وسایل لازم Error! Bookmark not defined.....

روش کار Error! Bookmark not defined.....

۳-٦- کشت و تکثیر سلولهای **MCF-7** در محیط **RPMI 1640** Error! Bookmark not defined.

مواد لازم Error! Bookmark not defined.....

روش کار Error! Bookmark not defined.....

۳-۷- جدا کردن سلولهای تکثیر یافته **MCF-7** و انتقال به پلیت ۹٦ خانه Error! Bookmark not defined.

مواد لازم Error! Bookmark not defined.....

روش کار Error! Bookmark not defined.....

۳-۸- تعیین درصد سلولهای زنده Error! Bookmark not defined.....

مواد لازم Error! Bookmark not defined.....

روش کار Error! Bookmark not defined.....

۳-۹- ترانس فکشن **Transfection** Error! Bookmark not defined..

مواد لازم Error! Bookmark not defined.....

روش کار Error! Bookmark not defined.....

۳-۱۰- استخراج **RNA** Error! Bookmark not defined.....

مواد لازم Error! Bookmark not defined.....

روش کار ..... Error! Bookmark not defined

۳-۱۱- بررسی کمی وکیفی **RNA** استخراج شده Error! Bookmark not defined..

۳-۱۱-۱- روش کمی توسط نانودراپ Error! Bookmark not defined..

مواد لازم ..... Error! Bookmark not defined

روش کار ..... Error! Bookmark not defined

۳-۱۱-۲- روش کیفی توسط الکترفورز Error! Bookmark not defined..

۳-۱۲- سنتز **cDNA** از **RNA** استخراج شده Error! Bookmark not defined..

۳-۱۲-۱- سنتز **cDNA** با پرایمر اختصاصی به روش **Stem loop RTPCR** Error! Bookmark not defined.

۳-۱۲-۲- سنتز **cDNA** با پرایمر عمومی Error! Bookmark not defined..

۳-۱۳- تکنیک **Real time PCR** Error! Bookmark not defined...

۳-۱۳-۱- مفهوم **Real time PCR** Error! Bookmark not defined..

۳-۱۳-۲-روش سنجش با**Real time PCR** Error! Bookmark not defined..

۳-۱۳-۳- روش تعیین کمیت با**Quantitative Real–time PCR** Error! Bookmark not defined.

۳-۱۳-٤-پرایمرها ی مربوط به ژنهای هدف و مرجع Error! Bookmark not defined..

۳-۱۳-۵- تهیه Master mix در واکنش Realtime PCR برای mir-29a و U6 snRNA
Error! Bookmark not defined.....

۳-۱۳-٦- تهیه Master mix در واکنش Realtime PCRبرای ژن GAPDH و سایر ژنهای هدف
Error! Bookmark not defined.....

فصل چهارم: نتایج..... ۷۹

٤-۱- نتایج بررسی تغییر بیان ژن miR-29a
Error! Bookmark not defined..

٤-۱-۱- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن miR-29a
Error! Bookmark not defined..

٤-۱-۲- محاسبه تغییرات بیان ژنmir-29a
Error! Bookmark not defined..

٤-۲- نتایج بررسی تغییر بیان ژن P21
Error! Bookmark not defined..

٤-۲-۱- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن P21
Error! Bookmark not defined..

٤-۲-۲- محاسبه تغییرات بیان ژن P21
Error! Bookmark not defined..

٤-۳- نتایج بررسی تغییر بیان ژن P53
Error! Bookmark not defined..

٤-۳-۱- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن P53
Error! Bookmark not defined..

٤-۳-۲- محاسبه تغییرات بیان ژن P53
Error! Bookmark not defined..

٤-٤- نتایج بررسی تغییر بیان ژن BCL2
Error! Bookmark not defined..

٤-٤-١- نمودار **Ct** و منحنی ذوب ژن **BCL2** Error! Bookmark not defined..

٤-٤-٢- محاسبه تغییرات بیان ژن **BCL2** Error! Bookmark not defined..

٤-٥- نتایج بررسی تغییر بیان ژن **Survivin** Error! Bookmark not defined..

٤-٥-١- نمودار **Ct** و منحنی ذوب ژن **Survivin** Error! Bookmark not defined..

٤-٥-٢- محاسبه تغییرات بیان ژن **Survivin** Error! Bookmark not defined..

فصل پنجم: بحث و پیشنهاد ها ١٠١

٥-١-بحث ١٠٢

٥-١-١-تغییرات بیان mir-29a ١٠٢

٥-١-٢-تغییرات بیان ژن P53 ..... ١٠٣

٥-١-٣- تغییرات بیان ژن P21 ..... ١٠٤

٥-١-٤- تغییرات بیان ژن BCL2 ..... ١٠٥

٥-١-٥- تغیرات بیان ژن SURVIVIN ١٠٥

٥-٢- نتیجه گیری نهایی ١٠٦

٥-٣- پیشنهادات ١٠٧

منابع ١٠٨

چکیده انگلیسی..... ۱۲۰

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۳- میزان شیوع ابتلا به سرطان پستان درگرو ه های مختلف سنی در زنان ۱٦

جدول ۱-۱ – مقایسه دو نوع تومور خوش خیم و بدخیم ۲۷

جدول۱-۲: مقایسه فرایند آپوپتوز و نکروز ۳۹

جدول ۲ – ۱- مقایسه در دو بافت سرطانی و غیر سرطانی ۵۱

جدول ۳-۱- ویژگی های سلولهای MCF – 7 ٥٦

جدول ۳-۲- ساخت Master mix برای ترانس فکشن ٦٤

جدول ۳-۳– معرفی گروه های مورد مطالعه ومحتویات آنها برحسب میکرولیتر ٦٥

جدول ۳-٤- مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای سنتز cDNA ۷۰

جدول ۳-۵ تهیه Master mix برای سنتز cDNA با پرایمراختصاصی mir 29a و U6 snRNA ۷۰

جدول ۳-٦ برنامه دمایی سنتز cDNA با پرایمر اختصاصی ۷۱

جدول ۳-۷- مواد مورد استفاده برای سنتز cDNA با پرایمرعمومی ۷۲

جدول ۳-۸- برنامه دمایی سنتز cDNA با پرایمر عمومی ۷۲

جدول ۳-۹- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در Realtime ۷۵

جدول ۳-۱۰- مواد مصرفی در مخلوط Realtime PCR برای miR-29a وU6 snRNA ۷٦

جدول۳-۱۱- برنامه حـرارتی Realtime PCR برای miR-29a و U6 snRNA ۷٦

جدول ۳-۱۲ مواد مصرفی در مخلوط Realtime PCR برای ژن GAPDH و سایِ ژن‌های هدف ۷۷

جدول ۳-۱۳- برنامه حرارتی Realtime PCR برای ژن GAPDH و سایِ ژن‌های هدف ۷۸

جدول ٤-۱- مقادیرCt ژن miR-29a وU6 snRNA ۸۰

جدول ٤-۲-نسبت تغییرات بیان ژن mir-29a در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل ۸۲

جدول ٤-۳- مقادیر Ct ژن P21 و GAPDH ۸٤

جدول ٤-٤-نسبت تغییرات بیان ژن P21 در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل ۸۷

جدول ٤-٦-نسبت تغییرات بیان ژن P53 در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل ۹۱

جدول ٤-٧- مقادیر Ct ژن BCL2 و GAPDH ۹۳

جدول ٤-٨-نسبت تغییرات بیان ژن BCL2 در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل ۹۵

جدول ٤-٩- مقادیر Ct ژن Survivin و GAPDH ۹۷

جدول ٤-١٠-نسبت تغییرات بیان ژن Survivin در گروههای تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل ۹۹

فهرست شکل ها

شکل ۱-٦ – قسمتهای تشکیل دهنده ی غدد پستانی سرطانی ۱۷

شکل ۱-۷ – مراحل چهار گانه سرطان پستان ۲۱

شکل۱-۱ مقایسه سلولهای سالم و سرطانی ۲۸

شکل ۱-۲- انتقال اپیتلیال –مزانشیمال و کاهش بیان کادهرین ۳۰

شکل ۱-۳- متاستاز در کارسینومای پستان ۳۱

شکل ۱-٤-منشا های احتمالی ایجاد سلول های بنیادی سرطانی ۳۳

شکل ۳-۱ تصویر الکتروفورز Total RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۲% ٦۸

شکل ٤-۱- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده ۸۰

شکل ٤-۲- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کالیبراتور و تیمار شده ۸۱

شکل ٤-۳- نمودار ستونی نسبت تغییرات بیان ژن mir-29a در گروههای تیمار شده به کالیبراتور ۸۳

شکل ٤-٤- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده ۸٤

شکل٤-٥- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کنترل و تیمار شده ۸٦

شکل ٤-٦- نمودار ستونی تغییرات بیان P21 پس از تیمار با Scramble، Anti mir-29a و Taxol ۸۸

شکل ٤-۷- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده ۸۹

شکل٤-۸- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کنترل و تیمار شده ۹۰

شکل ٤-۹- نمودار ستونی تغییرات بیان P53 پس از تیمار با Scramble، Anti mir-29a و Taxol ۹۱

شکل ٤-۱۰- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده ۹۲

شکل٤-۱۱- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کنترل و تیمار شده ۹٤

شکل ٤-۱۲- نمودار ستونی تغییرات بیان BCL2 پس از تیمار با Scramble، Anti mir-29a و Taxol ۹٦

شکل ٤-۱۳- منحنی PCR مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده ۹۷

شکل ٤-۱٤- نمودار منحنی ذوب برای گروههای کنترل و تیمار شده ۹۸

شکل ٤-۱٥- نمودار ستونی تغییرات بیان Survivin پس از تیمار با Scramble، Anti mir-29a و Taxol ۱۰۰

مقدمه

سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلولها بوجود می آید که ناشی از اختلالات ژنتیکی و عوامل محیطی است .چهار دسته از ژن های کلیدی که در هدایت سلول های سرطانی نقش دارند شامل آنکوژ نها، ژن های مهار کننده توموری، ژن های ترمیم کننده DNA و ژن های مرگ برنامه ریزی شده[1] هستند . عوامل محیطی موثر در سرطان نیز شامل ۳۰ ٪ دود سیگار ، ۳۵ ٪ رژیم غذایی ، ۲۵ ٪ بیماری های عفونی و ۱۰ ٪ مربوط به اشعه های یونی و غیر یونی می باشد .سرطان توسط یک سری جهش های متوالی در ژنها رخ می دهد[۱و۲].

سرطان پستان نیز یک بیماری متاثر از ژنتیک و یکی از شایعترین سرطان ها در زنان محسوب می شود . با اینکه علت این بیماری هنوز ناشناخته است اما میزان آن در صورت بروز برخ ی جهش های خاص ، افزایش می یابد . BRCA1 و BRCA2 دو ژن شناخته شده ای هستند که موتاسیون آنها در تولید و رشد سلولهای سرطان پستان نقش موثری دارد.

ژنBRCA1 بر روی کروموزوم 17q21 قرار دارد. این ژن پروتیینی می سازد که چندین خاصیت دارد که یکی از این خواص قدرت تصحیح ژن های معیوب است . همچنین شکستگی های دو رشته DNA را ترمیم نمایند . ژن BRCA-2 هم که روی کروزوم 13q14 می باشد پروتیینی می سازد که همانند پروتیین BRCA-1 عمل می کند. تشخیص جهش ژنی در سرطان پستان ازطریق آزمایش خون انجام می گیرد .ولی با این وجود این تست های تشخیصی قادر نیستند به وضوح نشان دهند که آیا سرطان پستان در فرد ایجاد خواهد شد یا نه. اما افرادی که دارای این جهش ژنی هستند ،بین ۵۵ تا ۸۵ درصد برای ژن BRCA1 و ۵۰

1-Apoptosis

تا ۸۵ درصد برای ژن BRCA2 شانس ابتلا به سرطان پستان را در طول زندگی خود خواهند داشت[۳–۸] در بررسی رشد و پیشرفت سرطان پستان ملکولهایی شناسایی شده اند از جمله RNA های غیر کدکننده ی تحت عنوان MicroRNA ها که در ایجاد سرطان موثر می باشند . برخی از انواع MicroRNA های موجود در سرم و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان از جمله mir- 29a نسبت به بقیه افزایش چشمگیرتری داشته اند[۹–۱٦] .بیان بیش از اندازه mir-29a در سرطان پستان، پروتئینی را مهار می کند که سبب ناپایداری برخی MicroRNA ها شده و منجر به پیشرفت تومور می شود [۱۷–۱۹]. همچنین تهاجم سلول و متاستاز در MCF-7 با ترنسفکت برخی از MicroRNA ها نیز در Invivo مشاهده شده است[۲۰ و ۲۱].

در سرطان پستان ملکولهای دیگری نیز به نام پروتئینهای Bcl2 , Survivin , P53 , P21 شناسایی شدند که بیان بالایی داشتند . این پروتئینها در فرایند آپوپتوز و مرگ سلولی نقش دارند . بنابراین می توان امیدوار بود در علم بیولوژی سلولی ملکولی، شناسایی انواع ملکولهای مرتبط با سرطان پستان از جمله MicroRNA ، P53 , P21 ... افق های جدیدی به روی ما گشوده تا بتوان از آنها جهت درمان سرطان استفاده کرد [۲۳ ، ۱۱ ، ۱۳].

فصل اول

کلیات

۱-۱ سرطان پستان

سرطان پستان بیماری است که در آن سلولهای بدخیم در بافت پستان تشکیل می شوند وعوامل خطرزا شامل سن بالا ، قاعدگی در سن پایین ،دریافت هورمونهای استروژن و پروژسترون ،داشتن سابقه خانوادگی ، جهش و تغییرات ژنتیکی... در آن نقش دارند. سرطان پستان یکی از شایعترین سرطانها با بالاترین درصد در میان زنان در سراسر جهان می باشد . بطوریکه حدود یک سوم تمامی سرطانهای زنان را شامل می شود و دومین علت مرگ به دلیل بدخیمی بعد از سرطان ریه برای آنهاست [۱۳۰].آمارهای جهانی نشان می دهد که شیوع سالیانه سرطان پستان در حال افزایش است و این امر در کشورهایی با میزان شیوع پایین سرطان پستان در حال وقوع می باشد [۱۳۱،۱۳۲] . بدلیل شیوع بالا هرساله بیش از یک میلیون خانم در دنیا با سرطان پستان تشخیص داده میشوند و۵۰۲ هزار نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند.[۱۳۳]در ایران نیز شیوع این بیماری رو به افزایش است و بیماران مبتلا به مراحل پیشرفته این بیماری ۱۰ سال جوانتر از همتایان خود در کشورهای غربی هستند [۱۳٤،۱۳۵]. اطلاعات دقیق و رسمی روی سن میزان ابتلا به سرطان پستان در زنان در هر ۱۰۰ هزار نفر از جمعیت در ایران در جدول ۱-۳ ارائه شده است [۱۳٦].

جدول ۱-۳- میزان شیوع ابتلا به سرطان پستان درگرو ه های مختلف سنی در زنان[۱۳۷]

گروه سنی	میزان شیوع
۱۵ – ۱۹	۰.۰۲
۲۰ – ۲٤	۰.۷۸
۲۵ – ۲۹	۵.۹۱
۳۰ – ۳٤	۱٤.۷٤
۳۵ – ۳۹	۳۳.۱٤
٤۰ – ٤٤	٤۷.۹۰
٤۵ – ٤۹	۷٤.۰۳
۵۰ – ۵٤	۷٤.۳۱
۵۵ – ۵۹	٦۹.۲۸
٦۰ – ٦٤	٦۹.۰۹
٦۵ – ٦۹	٤۸.۵۸
۷۰ – ۷٤	٤۳.۷۱
۷۵ – ۷۹	٤٤.۵۳
۸۰ – ۸٤	۵۸.٤۵
≥ ۸۵	۲۲.۰۹