

Research Paper

Evaluation of RKIP Gene Expression Changes of MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line after Microgravity Treatment

M. Salavatifar^{1*} and Z. Hajebrahimi²

1, 2. Department of Space Physiology, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, IRAN

*salavati@ari.ac.ir

Gravity is one of the most important forces exposed to the organisms on the earth which affects the cells, molecules and thus the entire of organism. The purpose of this study is to investigate the effect of the simulated microgravity on the changes of RKIP metastasis suppressor gene expression on MDA-MB-231 breast cancer cell line.

Materials and Methods: In order to impose microgravity state, cancer cells were placed on clinostat for one and three days. Then RNA was extracted from the cells and RKIP gene expression changes were evaluated by qReal time PCR.

Results: The findings showed that the microgravity during one day reduced the RKIP expression level, but with continuing up to three days, the expression returned to the control level.

Conclusion: By optimizing the duration of microgravity, it can be likely observed the significant effects on the RKIP gene expression changes and so that useful steps can be taken to discover the cancer mechanisms and its treatment.

Keywords: RKIP protein, MDA-MB-231 cell line, Microgravity, Metastasis, Clinostat

1. Assistant Professor (Corresponding Author)
2. Assistant Professor

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی تغییرات بیان ژن RKIP در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه پس از تیمار بی‌وزنی

مریم صلواتی فر^{۱*} و زهرا حاج ابراهیمی^۲

۱ و ۲- پژوهشگاه هوافضا وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

*تهران، کدپستی: ۱۴۶۵۷۷۴۱۱۱

salavati@ari.ac.ir

جاذبه از مهم‌ترین نیروهای وارده بر موجودات زنده روی زمین است که در طول حیات، بر سلول‌ها، مولکول‌ها و در نتیجه بر کل ارگانیسم تأثیرگذار است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر تغییرات بیان ژن سرکوبگر متاستاز RKIP در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه است. به منظور اعمال بی‌وزنی، سلول‌های سرطانی، در دو نوبت، به مدت یک روز و سه روز بر روی دستگاه کلینواستت قرار گرفتند. سپس RNA از سلول‌ها استخراج و تغییرات بیان ژن RKIP توسط qReal time PCR سنجش شد. نتایج یافت‌شده از این آزمایش نشان دادند که بی‌وزنی به مدت یک روز، سطح بیان ژن RKIP را کاهش داده اما با ادامه اعمال بی‌وزنی تا سه روز، بیان به سطح کنترل بازگشته است. در نتیجه با بهینه‌سازی مدت زمان تیمار بی‌وزنی، احتمالاً شاهد تغییرات چشمگیری در بیان ژن RKIP بوده تا از این طریق بتوان گام‌هایی را در کشف مکانیسم‌های درگیر در سرطان و درمان آن برداشت.

واژه‌های کلیدی: پروتئین RKIP، رده سلولی MDA-MB-231، بی‌وزنی، متاستاز، کلینواستت

زمین تحت نیروی جاذبه ۱ جی (۱g) قرار داشته و تمامی فرایندهای زیستی درون سلول‌های آن‌ها با این نیرو وفق یافته‌اند. مطالعات ثابت کرده‌اند که پروازهای فضایی بر فیزیولوژی بدن فضاانوردان تأثیر چشمگیری دارد که از جمله می‌توان به تغییر در سیستم ایمنی، تحلیل عضلات، کاهش تراکم استخوان و تغییر در متابولیسم برخی مواد اشاره نمود [۳-۶]. تغییرات فیزیولوژی حادث شده بر بدن فضاانوردان، بازتابی از تأثیر تغییرات جاذبه بر سلول‌ها و مولکول‌های بدن آن‌هاست. از این رو مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی، به درک مشکلات حادث شده برای فضاانوردان و دستیابی به راه حلی جهت فائق آمدن بر آن کمک می‌نماید و همچنین به گسترش علم زیست‌شناسی و حتی ارتقای حیات بر روی زمین منجر خواهد شد [۷]. به عنوان مثال با مطالعه سلول‌های ایمنی در شرایط بی‌وزنی، در تولید داروهای نوین برای حل مشکلات سیستم ایمنی از جمله خود ایمنی، گام‌های سازنده‌ای برداشته خواهد شد [۸].

مطالعات نشان داده‌اند که بی‌وزنی می‌تواند منجر به ایجاد تغییراتی در تکثیر سلولی، رشد و مسیرهای انتقال پیام درون سلول و

علائم و اختصارات

RAF	Raf Kinase Inhibitory Protein
MMP	Matrix Metalloproteinases
EDTA	Ethylene Diaminetetra Acetic Acid
TNBC	Triple Negative Breast Cancer Cell Lines
HEGFR2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

مقدمه

موجودات زنده، سلول‌ها و مولکول‌های مستقر در آن‌ها نسبت به نیروهای بیوفیزیکی از جمله جریان تنش برشی، جاذبه و الکترومغناطیس حساس بوده و این گونه نیروها می‌توانند اثرات بسیار گسترده‌ای بر روی فعالیت‌های زیستی موجودات زنده داشته باشند [۱، ۲]. تمامی موجودات بر روی کره

۱. استادیار (نویسنده مخاطب)

۲. استادیار

پروتئین سرکوبگر کیناز Raf یک تعدیل کننده فعالیت کیناز و یک عامل متعادل کننده شرایط سلول است که علاوه بر این، به عنوان سرکوبگر متاستاز در انواع تومورهای جامد از جمله سرطان سینه و پروستات عمل می نماید. این پروتئین ۲۳ کیلودالتونی کوچک سیتوپلاسمی، یکی از اعضای خانواده پروتئین های متصل شونده به فسفاتیدیل اتانل آمین بوده که در طول تکامل حفظ شده و در اغلب بافت ها در انواع متعددی از گونه های پستانداران از جمله میمون، موش و انسان بیان می شود [۱۹-۲۱]. یافته ها حاکی از آن است که این پروتئین در برخی سرطان ها، به عنوان مانعی برای متاستاز سرطان عمل کرده است [۲۲].

رده سلولی MDA-MB-231 مربوط به سرطان سینه، از نظر مورفولوژی، اپیتلیالی و دوکی شکل است. این سلول های تمایز نیافته بسیار مهاجم بوده و فاقد گیرنده های استروژن، پروژسترون و همچنین فاقد گیرنده ۲ عامل رشد اپیدرمی انسان (HER2) هستند. از این رو به این رده سلولی، سه گانه منفی (TNBC) اطلاق می شود. مشابه سایر رده های تهاجمی، قدرت تهاجمی این رده سلولی نیز از طریق قدرت تخریب پرتوتولیتیک ماتریکس خارج سلولی میانجی گری می شود [۲۳، ۲۴]. به علت فقدان بیان سه گیرنده استروژن، پروژسترون و HER2، این رده سلولی ابتدا به عنوان بازال طبقه بندی گردید. با این وجود هم اکنون، به دلیل بیان کم کلادین^۴-۳ و کلادینین^۵-۴، در زیرمجموعه مولکولی کم-کلادین^۶ طبقه بندی شده است [۲۵].

تحقیقات نشان داده است که رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه، پس از تزریق داخل عروقی به موش، به استخوان، مغز یا ریه متاستاز می دهد. سرطان سینه سه گانه منفی، یک مدل تهاجمی سرطان سینه با گزینه های محدود درمان است. از این رو شناخت اساس مولکولی این نوع رده سلولی و عوامل دخیل در مسیرهای متاستازی آن، برای توسعه درمان های اثرگذار، بسیار حیاتی است [۲۶-۲۸]. با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه حاضر به بررسی تأثیر حذف نیروی جاذبه بر روی میزان بیان پروتئین سرکوبگر متاستاز RKIP در رده سلولی MDA-MB-231 سرطان سینه می پردازد.

مواد و روش ها

رده سلولی MDA-MB-231 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد.

کشت سلولی

سلول ها در فلاسک T۱۲/۵ حاوی محیط کشت DMEM High glucose همراه با ۳/۷ g/l بی کربنات سدیم کامل شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین / استرپتومایسین کشت داده

میان سلول ها شود و از سوی دیگر سلول ها را در شرایط جدیدی قرار دهد که بتوان مکانیسم های سلولی را به نحو بهتری شناسایی و بررسی کرد [۹-۱۱]. به منظور مطالعه تأثیرات بی وزنی، می توان موجود یا سلول را در شرایط سقوط آزاد یا پرواز فضایی قرار داد. سفرهای فضایی به دلیل محدودیت و پرهزینه بودن، مقرون به صرفه نمی باشند. مدت زمان بی وزنی حادث شده در سقوط آزاد نیز به حدی کوتاه است که منجر به تغییرات مشخصی در سلول ها نمی شود. از این رو از دستگاه های شبیه ساز بی وزنی برای بررسی اثرات جاذبه بر سلول ها استفاده می گردد. یکی از آن ها دستگاه کلینواست است که برای مطالعات واکنش سلول ها در برابر تغییرات بردار جاذبه به کار می رود [۱۲].

بعد از بیماری های قلبی و عروقی، سرطان عامل ثانویه فوت در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله ایران است. سرطان سینه در جهان با میزان بروز ۱/۲ میلیون بیمار جدید در هر سال، شایع ترین بدخیمی در بین زنان بوده و نخستین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان آمریکایی است [۱۳]. طبق گزارش کشوری آمار سرطان، سرطان سینه در ایران اولین رتبه را در میان زنان دارد که از کل سرطان ها، ۱۶ درصد را به خود اختصاص می دهد [۱۴]. روش هایی که از گذشته تاکنون برای مهار پیشرفت بیماری سرطان سینه به کار گرفته می شود، شیمی درمانی و پروتو درمانی هستند اما به دلیل عدم انتخابی بودن تأثیر این گونه درمان ها بر سلول ها و بافت های سالم و آسیب دیده، عوارض جانبی و حتی آسیب های بافتی غیرقابل برگشتی در بخش های سالم بدن به همراه دارند [۱۵]. از سوی مقاومت دارویی در روند درمان نیز پیش آگهی ضعیفی را ایجاد می نماید [۱۶]. چالش های عنوان شده باعث می شوند رویکردهای درمانی جدید مورد توجه و بررسی قرار گیرند.

بیش از ۹۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان به دلیل متاستاز^۳ رخ می دهند. انتشار یک سرطان به قسمت جدید بدن، متاستاز نامیده می شود و به این نوع تومورها، تومورهای متاستاتیک اطلاق می شود. تومورهای ابتدایی ممکن است توسط درمان یا جراحی به خوبی درمان شوند اما سرطان هایی که به مرحله متاستاز رسیده اند به دلیل مقاومت به درمان، نشان دهنده فراوانی مرگ و میر در افراد دارای متاستاز هستند. از این رو درمان مؤثر سرطان، به شناخت کامل فرایندهای دخیل در متاستاز و تدبیر راه کارهای مقابله با آن ها وابسته است. یک روش مؤثر برای بررسی متاستاز، مطالعه ممانعت کننده های طبیعی این فرایند پیچیده یعنی سرکوبگرهای متاستاز است. سرکوبگرهای متاستاز پروتئین هایی هستند که می توانند بدون تأثیر بر ویژگی های رشدی تومور اولیه، گسترش سلول های تومور به سایر نقاط بدن را متوقف کنند [۱۷، ۱۸].

4. Claudin
5. Claudinin
6. Claudin-low

3. Metastasis

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از تیمار بی‌وزنی به منظور بررسی برخی تغییرات ژنتیکی رخ داده در سلول‌ها، از تمامی لوله‌های تست و کنترل، RNA تام استخراج شد. بدین منظور، از محلول RNX-PLUS (سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا محتوای هر لوله در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از دور ریختن محلول رویی، یک میلی لیتر از محلول RNX-PLUS سرد شده به هر لوله اضافه و پس از مخلوط کردن کامل با سلول‌ها، کل محلول به میکروتیوب انتقال داده شد و پس از ورتکس کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در مرحله بعد ۲۰۰ µl کلروفورم به هر میکروتیوب افزوده و پس از مخلوط شدن، در دمای ۴°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰ rpm و در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید. سپس فاز آبی (رویی) به میکروتیوب جدید منتقل شده و هم حجم با آن، ایزوپروپانل به لوله افزوده و کاملاً مخلوط شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰ rpm و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شده و ۱ ml اتانل ۷۵ درصد بر روی رسوب ریخته شد و پس از ورتکسی کوتاه، ۸ دقیقه، با دور ۷۵۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. پس از خشک شدن میکروتیوب‌ها، میزان ۵۰ µl آب عاری از RNase به هر تیوب افزوده شد و در دمای ۶۰-۵۵°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. خلوص و غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ارزیابی و کیفیت آن با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید. RNAهای به دست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

در مرحله بعد DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (Takara, Clontech) تکثیر شد. دستورالعمل کیت شامل دو مرحله بود که مرحله اول افزودن پرایمرهای Random Oligo-dT و Hexamer، بافر مربوطه و آنزیم نسخه بردار معکوس (Reverse Transcriptase) به ۲ میکروگرم RNA و مرحله دوم انکوباسیون در دمای ۳۷°C به مدت ۱۵ دقیقه که به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵°C ادامه پیدا می‌کرد [۳۱].

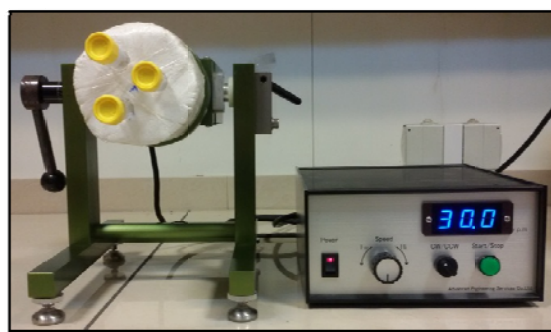
توالی پرایمرها و تأیید آنها

پرایمر مناسب به منظور تکثیر بخشی از ژن GAPDH (گلیسرآلدئید - ۳ - فسفات دهیدروژناز) [۳۲، ۳۳] و همچنین بخشی از ژن RKIP [۳۴]، جهت سنتز به شرکت MacroGen کره جنوبی سفارش داده شد. در این مطالعه ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع و RKIP به عنوان ژن هدف استفاده شد. توالی پرایمرهای به کار رفته در جدول ۱ آمده است.

شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد CO₂ و ۹۰ درصد رطوبت قرار گرفت. تمامی مواد لازم برای کشت از شرکت (Gibco, Life Technologies Carlsbad, CA, USA) تهیه شد. زمانی که سلول‌ها حداقل ۷۰ درصد کف فلاسک را پر کردند، پاساژ سلولی انجام شد. به این نحو که پس از تخلیه محیط و شستشو با PBS، سلول‌ها توسط تریپسین-EDTA (۰/۲۵ درصد) از کف فلاسک جدا شده و در ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بخشی از آن به فلاسک‌های جدید منتقل شده و مابقی فریز شدند [۲۹].

شبیه‌سازی بی‌وزنی

به منظور شبیه‌سازی بی‌وزنی از دستگاه کلینواستت یک محوره اهدایی از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو (United Nations Office at Vienna; The Office for Outer Space Affairs) استفاده شد (شکل ۱). این دستگاه با چرخاندن سلول‌ها باعث می‌شود که سلول‌ها قدرت درک جاذبه را از دست بدهند. بدین منظور ابتدا کلینواستت توسط اتانل ۷۵٪ و اشعه UV استریل شده و داخل انکوباتور کشت سلولی قرار گرفت. سپس تعداد ۲×۱۰^۶ سلول MDA-MB-231 به درون لوله‌های کشت سلول (Tissue culture tube, TPP company, Switzerland) منتقل شد. پس از چسبیدن سلول‌ها و پر کردن کف آن (حدود ۷۰ درصد)، محیط کشت لوله‌ها خالی شد و مجدداً با محیطی که از شب قبل به منظور CO₂ دار شدن، درون انکوباتور قرار گرفته بود پر شد. پر کردن لوله‌ها به منظور جلوگیری از حضور حباب و ایجاد نیروهای برشی، انجام شد. نمونه‌ها در مرکز کلینواستت ثابت شده و سرعت دستگاه بر روی ۳۰ rpm تنظیم گردید و در دو تست جداگانه، نمونه‌های اصلی (تحت تیمار بی‌وزنی) و کنترل (تحت نیروی جاذبه ۱ جی) به مدت ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت کشت داده شدند [۳۰]. برای هر تست سه تکرار در نظر گرفته شد.



شکل ۱- دستگاه کلینواستت

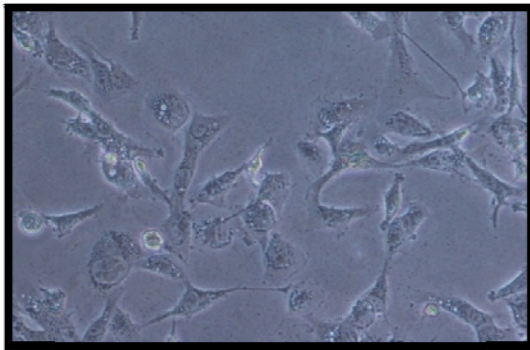
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)
GAPDH Forward	5'ACGACCACITTTGTCAAGCTCAT3'	۶۷
	5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'	
GAPDH Reverse	5'CAATGACATCAGCAGTGGCACAGTC3'	۲۴۹
	5'ACATAGTCATCCCACTCGGCCTG3'	

گرفته شد. همچنین نمودارهای مربوطه، با استفاده از برنامه Graphpad prism 7 ترسیم گردید.

نتایج

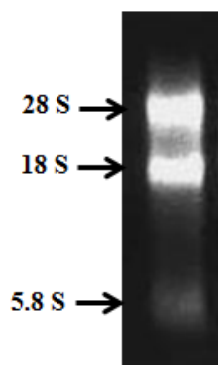
پس از تهیه رده سلولی MDA-MB-231، در محیط کشت DMEM High glucose و در شرایط کاملاً استریل کشت و تکثیر شدند. شکل ۲ تصویر این سلول‌ها را در محیط کشت نشان می‌دهد.



شکل ۲- سلول‌های MDA-MB-231 سرطان سینه

تعیین کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده

به منظور حصول اطمینان از عدم تجزیه RNAهای استخراج شده، کیفیت نمونه‌ها توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید. خلوص و غلظت RNA نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری ارزیابی شد. همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، وجود باندهای ۲۸ S، ۱۸ S و ۵/۸ S مربوط به RNA ریبوزومی، نشان‌دهنده استخراج صحیح RNA است (شکل ۳). نتایج حاکی از آن بود که RNA استخراج شده قابل مشاهده است. نتایج حاکی از آن بود که RNA استخراج شده می‌تواند با اطمینان در مراحل بعدی مطالعه، مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۳- بررسی کیفی RNA تام استخراج شده از سلول‌ها

در بررسی با اسپکتروفوتومتر نیز نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، عدد ۱/۸ نشان‌دهنده درجه خلوص بالای نمونه بود. در

جهت تأیید پرایمرها، PCR معمولی به شرح ذیل انجام شد: مخلوطی با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۲ μl از cDNA الگو مربوطه، ۱۰ μl 2X master mix PCR (Amplicon)، ۱ μl از هر یک از پرایمرهای بالادست و پایین دست (غلظت ۱۰ pmol/ul) و ۶ μl آب مقطر تهیه شد. سپس مخلوط درون دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) قرار گرفته و برنامه زمانی و دمایی زیر برقرار شد: ابتدا واسرشت نمودن اولیه cDNA الگو در دمای ۹۵ °C به مدت ۴ دقیقه انجام شده و سپس ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۴۰ ثانیه، و گسترش در ۶۸ °C به مدت ۳۵ ثانیه، ۳۵ بار تکرار و در انتها گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

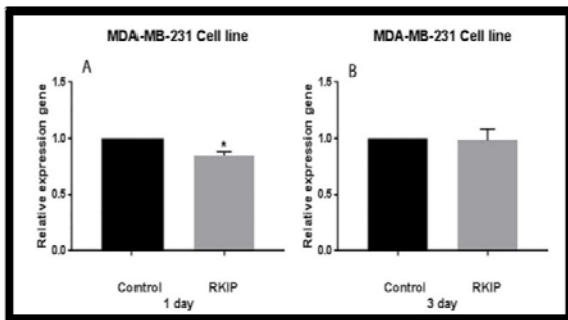
بررسی بیان ژن *RKIP* با روش *Relative quantification Real time PCR*

بررسی بیان ژن با روش *qReal time PCR* به وسیله دستگاه Step One Plus Real Time PCR (Bio-Rad, USA) با کیت SYBR premix Ex taqII (Takara) به صورت زیر انجام شد: مخلوطی با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۲ μl از cDNA الگو مربوطه، ۱۰ μl مستر میکس سایبرگرین، ۱/۶ μl از مخلوط پرایمرهای بالادست و پایین دست (از غلظت ۱۰ pmol/ul هر پرایمر)، ۰/۴ رنگ ROX و ۶ μl آب مقطر تهیه شد. سپس مخلوط درون دستگاه *Real Time PCR* قرار گرفته و مطابق با برنامه زمانی و دمایی زیر انجام پذیرفت: ابتدا واسرشت کردن cDNA الگو در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شده و سپس ۹۵ °C به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ °C به مدت ۳۵ ثانیه، ۴۰ بار تکرار شد. واکنش فوق برای هر نمونه cDNA انجام و Ct برای هر کدام محاسبه گردید [۳۵].

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار از حداقل دو آزمایش مستقل ارائه شده و آزمون *t-test* برای تجزیه تحلیل آماری به کار گرفته شد. از نظر آماری، *p-value* کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار در نظر

به منظور بررسی سطح بیان ژن سرکوبگر متاستاز RKIP، از qRT-PCR استفاده شد. همانگونه که در نمودارهای شکل ۶ مشاهده می‌شود، سطح بیان رونوشت ژن RKIP در نمونه‌هایی که به مدت ۱ روز تحت تیمار بی‌وزنی قرار گرفته بودند نسبت به نمونه‌های کنترل که تحت گرانش طبیعی ۱g بودند، به طور معنی‌داری دچار کاهش بیان شده بود ($p \text{ value} < 0.05$) (نمودار A شکل ۶) اما در نمونه‌هایی که به مدت طولانی‌تر یعنی ۳ روز تحت تیمار بی‌وزنی باقی مانده بودند، تفاوت بیان معنی‌داری با نمونه‌های کنترل در مورد بیان ژن RKIP مشاهده نشد ($p \text{ value} > 0.05$) (نمودار B شکل ۶).



شکل ۶- تغییرات بیانی ژن RKIP نسبت به ژن خانه‌دار GAPDH (کنترل) پس از تیمار بی‌وزنی در واکنش qRT-PCR.

بحث و نتیجه‌گیری

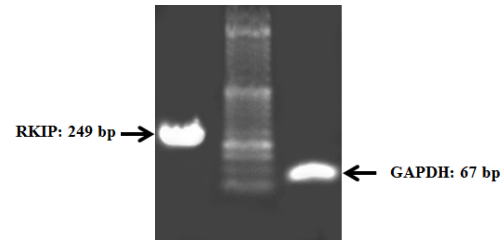
جاذبه یکی از مهم‌ترین نیروهای مکانیکی وارده بر موجودات زنده روی کره زمین است که تغییر در میزان آن، بر فیزیولوژی موجودات زنده، فعالیت سلول‌ها و بیان ژن‌ها اثرگذار است [۳۷]. به دلیل اینکه انجام مطالعات در شرایط واقعی بی‌وزنی (پروازهای فضایی) بسیار دشوار و پرهزینه است، دستگاه‌های متعددی برای شبیه‌سازی شرایط بی‌وزنی بر روی زمین طراحی و ساخته شده‌اند که می‌توان به انواع تک‌محوره (کلینواست) و سه محوره برای سلول‌های گیاهی و جانوری و همچنین قفس بی‌وزنی برای شبیه‌سازی نبود جاذبه در جوندگان اشاره کرد [۳۸، ۳۹]. در این پژوهش دستگاه کلینواست تک‌محوره که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضایی اخذ شده بود به منظور شبیه‌سازی بی‌وزنی استفاده شد.

سرطان سینه یک بیماری هتروژن است که از لحاظ بیولوژیکی انواع متنوعی دارد. انواع مختلفی از این بیماری پاسخ مناسبی به درمان می‌دهند، اما سرطان سینه سه گانه منفی که ۱۵ درصد از کل سرطان‌های سینه را به خود اختصاص داده است، به شیمی درمانی و سایر درمان‌ها پاسخ مناسبی نمی‌دهد. درمان TNBCها که از نظر سه نوع گیرنده استروژن و پروژسترون و HER2 منفی است، به دلیل هتروژن بودن بیماری و عدم وجود این

مجموع، نتایج حاکی از آن است که RNA استخراج شده در مرحله بعدی با اطمینان بالا، قابل کاربرد است.

تأیید پرایمرهای سنتز شده

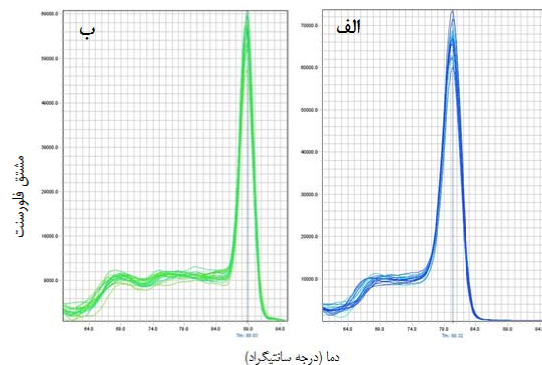
پس از سنتز cDNA، جهت تأیید پرایمرها، PCR معمولی انجام شده و سپس نمونه‌ها بر ژل آگارز ۱/۵ درصد ران شدند. مشاهده دو باند ۲۴۹ و ۶۷ جفت بازی، مؤید تکثیر ژن‌های RKIP و GAPDH بودند (شکل ۴).



شکل ۴- تأیید پرایمرها توسط نتایج تکثیر بخشی از ژن‌های GAPDH و RKIP. ستون میانی. 50 bp DNA ladder (sinaclone) Cat. No. SL7021.

بررسی تغییرات بیانی ژن RKIP در سلول‌ها

رنگ سایبرگرین که برای ردیابی محصول PCR به کار می‌رود، به هر گونه DNA دو رشته‌ای متصل شده و توانایی تشخیص محصولات اختصاصی و غیراختصاصی از یکدیگر را ندارد و حتی مابین دایمر آغازگر قرار گرفته و سبب افزایش شدت نور فلورسنت می‌شود [۳۶]. با توجه به این مسئله، به منظور تأیید صحت قطعات تکثیری و اطمینان از عدم وجود محصول غیراختصاصی، نمودار ذوب^۸ بررسی شد. در این نوع نمودار، وجود تنها یک قله^۹ برای هر ژن در دمای ذوب ویژه خودش، اختصاصی بودن محصول PCR را ثابت می‌کند (شکل ۱).



شکل ۵- منحنی‌های ذوب ژن‌های مورد مطالعه در آزمون Real Time PCR. منحنی ذوب ژن مرجع GAPDH (الف) و ژن مورد مطالعه RKIP (ب). وجود تنها یک قله در دمای ذوب ویژه برای هر ژن، نشانگر اختصاصی بودن محصول است.

8. Melting curve
9. Peak

داشته در حدی که به سطح بیان اولیه بازگشته است. از این رو، مدت زمان تیمار بی‌وزنی، در نتایج حاصله دارای اهمیت است و بهینه‌سازی زمان، به منظور نیل به حداکثر بیان پروتئین *RKIP*، در حصول بهترین نتیجه مؤثر خواهد بود و احتمال دارد با طولانی‌تر کردن زمان بی‌وزنی، شاهد اثرات قابل توجه در این ژن سرکوبگر متاستاز باشیم. با توجه به نتایج اخذ شده، شبیه‌سازی بی‌وزنی افعی‌های نوینی را در درمان سرطان و ممانعت از متاستاز به سایر اندام‌ها خواهد گشود. امید است با تحقیقات بیشتر در آینده بر روی ژن‌های سرکوبگر متاستاز و به ویژه محصولات پروتئینی آن‌ها، بتوان از این روش به عنوان یک راه کار جدید درمانی بهره برد. در مجموع، بی‌وزنی شرایطی جدید برای انجام مطالعات زیستی و پزشکی را فراهم می‌آورد و مطالعه سلول‌ها و مولکول‌ها در این شرایط ویژه، خواهد توانست اطلاعات گران مایه‌ای را در مورد نحوه پیدایش و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها در اختیار دانشمندان قرار دهد و منجر به روشن شدن نقاط مبهمی در علوم زیستی شود.

مراجع

- [1] Rea, G., Cristofaro, F., Pani, G., Pascucci, B., Ghuge, S.A., Corsetto P.A. and *et al.*, "Microgravity-Driven Remodeling of the Proteome Reveals Insights into Molecular Mechanisms and Signal Networks Involved In Response to the Space Flight Environment," *Journal of Proteomics*, vol. 137, 2016, pp. 3-18.
- [2] Funk, R.H., Monsees, T. and Özkucur, N., "Electromagnetic Effects-From Cell Biology to Medicine," *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 43, 2009, pp. 177-264.
- [3] Basso, N., Jia, Y., C. Bellows, G. and Heersche, J. N., "The Effect of Reloading on Bone Volume, Osteoblast Number, and Osteoprogenitor Characteristics: Studies in Hind Limb Unloaded Rats," *Bone*, vol. 37, 2005, pp. 370-378.
- [4] Grimm, D., Grosse, J., Wehland, M., Mann, V., Reseland, J. E., Sundaresan, A. and *et al.*, "The Impact of Microgravity on Bone in Humans," *Bone*, vol. 87, 2016, pp. 44-56.
- [5] Shearer, W. T., Ochs, H. D., Lee, B.-N., Cohen, E. N., Reuben, J. M., Cheng, I. and *et al.*, "Immune Responses in Adult Female Volunteers During the Bed-Rest Model of Spaceflight: Antibodies and Cytokines," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 123, 2009, pp. 900-905.
- [6] Salavatifar, M., "An Overview of Changes in Immune System in Space and Microgravity Conditions," *Journal of Technology in Aerospace Engineering*, vol. 1, 2018, pp. 1-10.
- [7] Liu, Q., Zhou, R.-L., Zhao, X., Chen, X.-P. and Chen, S.-G., "Acclimation During Space Flight: Effects on Human Emotion," *Military Medical Research*, vol. 3, 2016, p. 15.
- [8] Luo, H., Wang, C., Feng, M. and Zhao, Y., "Effects of Microgravity on Immune Cells," *Chinese Science Bulletin*, vol. 58, 2013, pp. 2679-2689.

گیرنده‌ها با چالش بزرگی روبرو است. بنابراین، در درمان این نوع سرطان سینه، هورمون درمانی یا داروهایی که هدف آن‌ها HER2 است کارایی ندارند. از این رو یافتن روش درمانی جدید برای آن‌ها، نتیجه ارزشمندی است [۴۰]. پروتئین‌های سرکوبگر متاستاز قادرند در مراحل مختلف فرایند متاستاز مداخله کنند. دنگی گریملا^{۱۰} و همکارانش ثابت کرده‌اند که پروتئین *RKIP* در چندین سرطان به عنوان سرکوبگر متاستاز ایفای نقش کرده است [۲۲]. همچنین ثابت شده است که در مدل موشی، برقراری مجدد بیان ژن *RKIP*، برای مهار متاستاز سرطان سینه کافی است [۴۱]. در دو مطالعه ثابت شده است که بیان ژن *RKIP* در سرطان کبد، بسیار کمتر از بافت‌های سالم مجاور است و افزایش در بیان ژن *RKIP* می‌تواند تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان کبد را کاهش دهد [۴۲، ۴۳]. در مطالعه‌ای دیگر که توسط دیتیر^{۱۱} و همکاران انجام شده، ثابت شده است که افزایش بیان ژن *RKIP* باعث مهار برخی از اعضای خانواده MMP شده و از این طریق مانع تهاجم سلول‌های سرطانی به مکان‌های ثانویه می‌شود [۴۴]. هائو^{۱۲} و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، با وارد کردن ژن *RKIP* از طریق حامل به سلول‌های MDA-MB-231، شاهد کاهش قدرت رشد و تکثیر سلولی و میزان مهاجرت سلول‌ها بودند. علاوه بر این، مشاهده شده است که کاهش بیان *RKIP* در آزمایشگاه، موجب افزایش قدرت زنده ماندن و مهاجرت سلول‌ها شده است [۱۹]. در مطالعه حاضر به بررسی اثر بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر تغییرات بیان ژن سرکوبگر متاستاز *RKIP* پرداختیم. از این رو دست‌یابی به روشی که بتواند باعث افزایش تولید سرکوبگرهای متاستاز در سلول‌های سرطانی شود، در ممانعت از فراگستری سرطان به سایر بافت‌ها و مهار بیماری، دستاوردی ارزشمند خواهد بود.

در این مطالعه، برای اولین بار تغییرات بیانی یک ژن سرکوبگر متاستاز در رده سلول سرطانی MDA-MB-231 در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. نتایج مستخرج از این پروژه تحقیقاتی نشان داد که ژن *RKIP* که محصول پروتئینی آن یک پروتئین سرکوبگر متاستاز است، ابتدا پس از قرارگیری سلول‌ها به مدت یک شبانه‌روز در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده در مقایسه با نمونه‌های کنترل، به طور معنی داری دچار کاهش بیان شده است. اما با ادامه اعمال بی‌وزنی تا ۷۲ ساعت، نسبت به نمونه‌های کنترل، تغییرات بیان معنی‌داری مشاهده نشد. به عبارت دیگر، ابتدا کاهش بیان را شاهد بودیم اما با طولانی‌تر کردن شرایط نبود جاذبه، بیان *RKIP* مجدداً افزایش

10. Dangi-Garimella
11. Datar
12. Hao

- [23] Chavez, K.J., Garimella, S.V. and Lipkowitz, S., "Triple negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer," *Breast Disease*, vol. 32, 2010, p. 35.
- [24] Liu, H., Zang, C., Fenner, M., Possinger, K. and Elstner, E., "PPAR γ Ligands and ATRA Inhibit the Invasion of Human Breast Cancer Cells in Vitro," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 79, 2003, pp. 63-74.
- [25] Holliday, D. L. and Speirs, V., "Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research," *Breast Cancer Research*, vol. 13, 2011, p. 215.
- [26] Bos, P.D., Zhang, X. H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, Nguyen, R. R. D. X. and *et al.*, "Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to the Brain," *Nature*, vol. 459, 2009, p. 1005.
- [27] Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D. D. and *et al.*, "Genes that Mediate Breast Cancer Metastasis to Lung," *Nature*, vol. 436, 2005, p. 518.
- [28] Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C. and *et al.*, "A Multigenic Program Mediating Breast Cancer Metastasis to Bone," *Cancer Cell*, vol. 3, 2003, pp. 537-549.
- [29] Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique and Specialized Applications*: John Wiley & Sons, 2015.
- [30] Matsuoka, R., Ohkubo, S., Yoshida, M. and Nakahata, N., "Alteration of Adenylyl Cyclase Type 6 Expression in Human Astrocytoma Cells After Exposure to Simulated Microgravity," *Journal of health science*, vol. 53, 2007, pp. 534-542.
- [31] T. Maniatis, "Molecular Cloning," *A Laboratory Manual*, 1982.
- [32] M. Krams, A. Claviez, K. Heidorn, G. Krupp, R. Parwaresch, D. Harms, *et al.*, "Regulation of telomerase activity by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas," *The American journal of pathology*, vol. 159, pp. 1925-1932, 2001.
- [33] C. Wu, X. Wang, M. Zhong, H. Liu, Q. He, X. Yang, *et al.*, "Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR studies in human hepatoma cell lines treated with TNF- α ," *Acta Biochim Biophys Sin*, vol. 45, pp. 780-786, 2013.
- [34] W. Guo, Z. Dong, X. Lin, M. Zhang, G. Kuang, and T. Zhu, "Decreased expression and aberrant methylation of Raf kinase inhibitory protein gene in esophageal squamous cell carcinoma," *Cancer investigation*, vol. 30, pp. 703-711, 2012.
- [35] S. A. Bustin, "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays," *Journal of molecular endocrinology*, vol. 25, pp. 169-193, 2000.
- [36] M. L. Wong and J. F. Medrano, "Real-time PCR for mRNA quantitation," *Biotechniques*, vol. 39, pp. 75-85, 2005.
- [37] A. Winnard, M. Nasser, D. Debus, M. Stokes, S. Evetts, M. Wilkinson, *et al.*, "Systematic review of countermeasures to minimise physiological changes and risk of injury to the lumbopelvic area following long-term microgravity," *Musculoskeletal Science and Practice*, vol. 27, pp. S5-S14, 2017.
- [9] Versari, S., Villa, A., Bradamante, S. and Maier, J. A., "Alterations of the Actin Cytoskeleton and Increased Nitric Oxide Synthesis are Common Features in Human Primary Endothelial Cell Response To Changes in Gravity," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1773, pp. 1645-1652, 2007.
- [10] S. Versari, G. Longinotti, L. Barengi, J. A. M. Maier, and S. Bradamante, "The challenging environment on board the International Space Station affects endothelial cell function by triggering oxidative stress through thioredoxin interacting protein overexpression: the ESA-SPHINX experiment," *The FASEB Journal*, vol. 27, pp. 4466-4475, 2013.
- [11] J. A. Maier, F. Cialdai, M. Monici, and L. Morbidelli, "The impact of microgravity and hypergravity on endothelial cells," *BioMed research international*, vol. 2015, 2015.
- [12] R. Hemmersbach, M. von der Wiesche, and D. Seibt, "Ground-based experimental platforms in gravitational biology and human physiology," *Signal Transduction*, vol. 6, pp. 381-387, 2006.
- [13] N. Samadi, C. Gaetano, I. Goping, and D. Brindley, "Autotaxin protects MCF-7 breast cancer and MDA-MB-435 melanoma cells against Taxol-induced apoptosis," *Oncogene*, vol. 28, p. 1028, 2009.
- [14] M. R. Gohari, J. Abolghasemi, and M. Mohammadi, "Prognostic factors of metastases in breast cancer patients using the recurrent Andersen-Gill model," *Koomesh*, vol. 14, pp. 483-489, 2013.
- [15] M. Sabzichi, H. Hamishehkar, F. Ramezani, S. Sharifi, M. Tabasinezhad, M. Pirouzpanah, *et al.*, "Luteolin-loaded phytosomes sensitize human breast carcinoma MDA-MB 231 cells to doxorubicin by suppressing Nrf2 mediated signalling," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, pp. 5311-5316, 2014.
- [16] S. Ramos, "Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways," *Molecular nutrition & food research*, vol. 52, pp. 507-526, 2008.
- [17] I. Khan and P. S. Steeg, "Metastasis suppressors: functional pathways," *Laboratory Investigation*, vol. 98, p. 198, 2018.
- [18] S. Valastyan and R. A. Weinberg, "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms," *Cell*, vol. 147, pp. 275-292, 2011.
- [19] J. Escara-Wilke, K. Yeung, and E. T. Keller, "Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in cancer," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 31, pp. 615-620, 2012.
- [20] H. Z. Li, Y. Gao, X. L. Zhao, Y. X. Liu, B. C. Sun, J. Yang, *et al.*, "Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human breast cancer," *Molecular Cancer Research*, 2009.
- [21] Wottrich, S., Kaufhold, S., Chrysos, E., Zoras, O., Baritaki, S. and Bonavida, B., "Inverse correlation between the metastasis suppressor RKIP and the metastasis inducer YY1: contrasting roles in the regulation of chemo/immuno-resistance in cancer," *Drug Resistance Updates*, vol. 30, pp. 28-38, 2017.
- [22] S. Dangi-Garimella, J. Yun, E. M. Eves, M. Newman, S. J. Erkeland, S. M. Hammond, *et al.*, "Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7," *The EMBO journal*, vol. 28, pp. 347-358, 2009.

- metalloproteinase expression," *Cancer letters*, vol. 299, pp. 137-149, 2010.
- [42] H. C. Lee, B. Tian, J. M. Sedivy, J. R. Wands, and M. Kim, "Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells," *Gastroenterology*, vol. 131, pp. 1208-1217, 2006.
- [43] Y.-F. Xu, Y. Yi, S.-J. Qiu, Q. Gao, Y.-W. Li, C.-X. Dai, *et al.*, "PEBP1 downregulation is associated to poor prognosis in HCC related to hepatitis B infection," *Journal of hepatology*, vol. 53, pp. 872-879, 2010.
- [44] I. Datar, J. Feng, X. Qiu, J. Lewandowski, M. Yeung, G. Ren, *et al.*, "RKIP inhibits local breast cancer invasion by antagonizing the transcriptional activation of MMP13," *PloS one*, vol. 10, p. e0134494, 2015.
- [38] D. E. Claassen and B. S. Spooner, "Impact of Altered Gravity on Aspects of," in *International review of cytology*. vol. 156, ed: Elsevier, 1994, pp. 301-373.
- [39] G. Aleshcheva, J. Bauer, R. Hemmersbach, M. Egli, M. Wehland, and D. Grimm, "Tissue engineering of cartilage on ground-based facilities," *Microgravity science and technology*, vol. 28, pp. 237-245, 2016.
- [40] M. Yamamoto, M. Hosoda, K. Nakano, S. Jia, K. C. Hatanaka, E. Takakuwa, *et al.*, "p53 accumulation is a strong predictor of recurrence in estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with aromatase inhibitors," *Cancer science*, vol. 105, pp. 81-88, 2014.
- [41] A. B. Beshir, G. Ren, A. N. Magpusao, L. M. Barone, K. C. Yeung, and G. Fenteany, "Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor- κ B-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix