



## Effect of Vincristine on miRNA-15a expression in Epstein-Barr-Virus transformed B cell-CO 88BV59-1 LCL

Abdolreza Sotoodeh Jahromi<sup>1</sup>, Maliheh Moradzadeh<sup>2</sup>, Farshid Kafilzadeh<sup>1</sup>, Mohammad Kargar<sup>1</sup>, Marzieh Jamalidoust<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

<sup>2</sup>Golestan rheumatology research center, Sayad shirazi hospital, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

<sup>3</sup>Clinical microbiology research center, Namazi hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Despite advances in diagnosis and therapy, cancer is still the main cause of death in world. Vincristine is one the major drug in tumor treatment. However, the anti-lymphoma effects of Vincristine on micro-RNA expression are not clear, especially in B cell lymphomas. The aim of the present study was to evaluate the effects of Vincristine on miRNA-15a3p and miRNA-15a5p genes expression Epstein-Barr-Virus (EBV)-infected transformed B cell lymphoma.

**Materials & Methods:** The effects of cyclophosphamide on CO 88BV59-1 LCL – an EBV infected transformed B cell was evaluated. The cells were treated with Vincristine (0.050-50  $\mu$ M), for 24-72 hours. MTT, flow cytometry and real-time PCR techniques were used for cell viability, and cytotoxicity evaluations and miRNA-15a genes expression, respectively.

**Results:** Vincristine significantly inhibited proliferation and induced cell death in EBV infected cell-line in a dose and time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). There were no significant changes in the expression of miRNA-15a3p and miRNA-15a5p in treated cells compared to untreated cells ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** The results showed that cytotoxic effects Vincristine on CO 88BV59-1 LCL is independent on miRNA-15a3p and miRNA-15a5p expressions.

**Keywords:** Vincristine, Micro-RNA, B cell lymphoma, CO 88BV59-1 LCL.

Received: 18 July 2021

Revised: 10 November 2021

Accepted: 16 December 2021

Correspondence to: Mohammad Kargar

Tel: +98 9173149203

E-mail: [microkargar@gmail.com](mailto:microkargar@gmail.com)

Journal of Microbial World 2021, 14(3): 6-15

DOI10.30495/jmw.2021.690431



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## تاثیر وینکریستین بر میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در سلول B

### ترانسفورم شده با ویروس اپشتاین بار (CO 88BV59-1 LCL)

عبدالرضا ستوده جهرمی<sup>۱</sup>، ملیحه مرادزاده<sup>۲</sup>، فرشید کفیل زاده<sup>۱</sup>، محمد کارگر<sup>۳\*</sup>، مرضیه جمالی دوست<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. <sup>۲</sup> مرکز تحقیقات روماتولوژی گلستان، بیمارستان صیاد شیرازی گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. <sup>۳</sup> مرکز تحقیقات میکروب شناسی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

#### چکیده

**سابقه و هدف:** با وجود پیشرفت ها در تشخیص و درمان، سرطان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در دنیاست. وینکریستین از جمله داروهای مهم در درمان سرطان است ولی هنوز اثرات ضد لنفومای این دارو به ویژه در لنفوم سلول B بر روی بیان miRNA مشخص نیست. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر وینکریستین بر سایتوتوکسیسیتی و بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در سلول B ترانسفورم شده به ویروس اپشتاین بار ویروس (EBV) بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، تاثیر وینکریستین بر رده سلولی CO 88BV59-1 LCL که سلول B ترانسفورم شده با EBV می باشد، مورد بررسی قرار گرفت. سلول ها به مدت ۳ روز با وینکریستین (۰/۰۵۰ تا ۵۰ میکرومول) تیمار شدند. میزان زنده ماندنی سلول، مرگ سلولی و بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p به ترتیب با استفاده از تکنیک MTT، فلوسیتومتری و Real-Time PCR بررسی قرار شد.

**یافته ها:** وینکریستین به طور معنی داری باعث مهار تکثیر و آپوپتوز در سلول های آلوده به EBV به صورت وابسته به دوز و زمان شد ( $P < 0.05$ ). در سلول های تیمار شده با وینکریستین تغییر معنی داری از میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در مقایسه با سلول های تیمار نشده وجود نداشت.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که تاثیر سایتوتوکسیسیتی وینکریستین در کاهش زنده ماندنی و افزایش مرگ سلولی در سلول های B ترانسفورم شده آلوده به EBV مستقل از تغییر بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p می باشد.

**واژگان کلیدی:** وینکریستین، لنفوم سلول B، میکرو آر ان آ.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۲۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۹

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۲۷

#### مقدمه

۹۰٪ شیوع دارد (۱ و ۲). EBV باعث تکثیر بی رویه سلول های B و تضعیف سیستم ایمنی در بدن و باعث بیماری لنفوپرولیفراتیو می شود و با بدخیمی های سلول B از جمله لنفوم هوچکین (HL) لنفوم بورکیت (BL) و بیماری لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند Post transplantation

ویروس اپشتاین بار Epstein-Barr Virus (EBV) یکی از اعضای خانواده هرپس گاماویروس است که در جامعه بیش از

\* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.  
تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳  
پست الکترونیک: microkargar@gmail.com



داروهای ضد ویروسی مانند آسیکلوویر و گانسیکلوویر که برای درمان بقیه اعضای این خانواده استفاده می‌شود، برای عفونت‌های حاصله از این ویروس نیز می‌توان استفاده کرد، اما این داروها در درمان PTLD حاصل از EBV کارایی موثر را ندارند. وینکریستین در درمان اختلالات لنفوپرولیفراتیو و سایر لنفوم‌ها مانند بورکیت لنفوما، هوچکین لنفوما و لنفوم سلول B بزرگ منتشره (Large diffused B cell lymphoma) و PTLD استفاده می‌شود (۱۶).

از آنجاکه تا کنون تاثیر وینکریستین بر روی بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در لنفوم آلوده به EBV مورد بررسی قرار نگرفته است، این تحقیق با هدف بررسی اثر وینکریستین بر سایتوتوکسیسیتی و بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در لنفوم آلوده به EBV بر روی سلول B ترانسفورم شده با EBV (رده سلولی CO 88BV59-1) انجام شد.

### مواد و روش‌ها

لنفوسیت‌های B سرطانی آلوده به EBV رده CO 88BV59-1 با کد سلولی CRL-10624 از ATCC خریداری شد. وینکریستین از شرکت سیگما و دیگر مواد لازم از قبیل تریپسین (Trypsin-EDTA)، MTT، محیط کشت (RPMI 1640)، آنکسین Annexin-V-(FITC) و پروپیدیوم آیویدید (propidium iodide, PI) از شرکت مرک، کیت استخراج (RNA extraction Kit (TRIZOL reagent))، کیت RT-PCR از شرکت روش (Roche) و کیت ساخت cDNA از شرکت فرمتاز (Fermentas) خریداری شد. این پروژه تحقیقی در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1399.026 به تصویب رسیده است.

الف) تعیین میزان سلول‌های زنده به وسیله تکنیک MTT: به منظور تعیین غلظت موثری از وینکریستین که باعث مرگ سلولی نیمی از سلول‌ها (IC50) می‌شود، از آزمایش MTT استفاده شد. ابتدا سلول‌های رده CO 88BV59-1 در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با 10% FBS و حاوی غلظت‌های

lymphoproliferative disease (PTLD) همراه است. EBV از طریق تغییر در بیان هر یک از RNAs کوچک یا microRNA (miRNA)، یک گروه از RNAs کوچک غیر کدکننده در سلول‌های آلوده و در پی آن تغییر بیان ژن‌های سلولی باعث نامیرا شدن و یا سرطانی شدن سلول آلوده می‌شود (۳).

miRNAs ۱۸-۲۳ نوکلوتیدی غیر کدکننده هستند که بیان ژن را در مرحله پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. حدود یک سوم بیان ژنی در بدن انسان توسط miRNAs تنظیم می‌شود. miRNAs همراهی نزدیکی با بیماری‌های مختلف از جمله سرطان دارند (۴) و به طور متوسط بیان ۳۰٪ از ژنوم را تنظیم می‌کند (۵).

با توجه به اینکه miRNAs بیان طیف وسیعی از پروتین‌ها را تنظیم می‌کند، تقریباً در تنظیم همه فرآیندهای زیستی از جمله تکوین و شکل‌گیری اندام‌ها و دستگاه‌های بدن (۶)، حفظ حالت خودتکثیری و تمایز سلول‌های بنیادی (۷)، افزایش آپوپتوز (۸)، تنظیم و تکوین سیستم ایمنی (۹)، تومورزایی (۱۰)، سرکوب تومور، متاستاز و مقاومت دارویی (۱۱) نقش دارند. miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در جایگاه ژنی 13 14q قرار دارند و از تنظیم‌کننده‌های منفی پروتین BCL-2 هستند و بعنوان miRNA سرکوب‌گر تومور محسوب می‌شوند (۱۲ و ۱۳).

در بیشتر سلول‌های آلوده به EBV، کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-15a گزارش شده است که این اتفاق باعث افزایش فعالیت ژن BCL-2 می‌شود و در نتیجه افزایش فعالیت و تکثیر بی‌رویه سلول‌های توموری (۱۴)، کاهش آپوپتوز و نامیرایی سلول بدن‌بال دارد (۱۵).

بیماری PTLD به دلیل ورود EBV از طریق دهنده پیوند EBV+ به گیرنده پیوند رخ می‌دهد و یا حتی ممکن است فرد گیرنده پیوند قبل از دریافت پیوند به ویروس EBV آلوده باشد و ویروس را بصورت نهفته در بدن خود داشته باشد و به دلیل فعال شدن ویروس در نتیجه تضعیف سیستم ایمنی، بیماری PTLD رخ دهد (۲).

تیمار سلول‌ها، تمام RNA سلول‌ها به وسیله کیت RNeasy mini kit طبق پروتکل مربوطه استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA حاصله با کیت RNase-free DNase تیمار و غلظت آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین گردید (۱۷). از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲/۲ داشتند برای ساخت cDNA استفاده شد. یک میکرولیتر از پرایمرهای (۲۵ میکرومولار) (نسخه برداری معکوس) عمومی miRNA USTL، universal step loop primer (۱۸) (جدول ۱) و دو میکروگرم از RNA رقیق شده در آب دو بار تقطیر (RNase free) به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. به منظور دناتوراسیون ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و فوراً بر روی یخ منتقل شد. چهار میکرولیتر از بافر 5×RT، چهار میکرولیتر dNTPs mix، یک میکرولیتر آنزیم ReverTra Ace (100 U/μL; TOYOBO, Osaka, Japan) و ۱۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر (RNase free) به آن اضافه شد و در ۴۲ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت گرماگذاری شد و سپس ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. cDNA حاصل بعنوان یک cDNA کلی برای بررسی میزان بیان هر دو نوع miRNA-15a3p و miRNA-15a5p و به روش Real Time PCR بررسی شد. هر تیمار سلولی در هر کدام از مدت زمان تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) سه بار تکرار شد و برای هر تکرار سه بار آزمایش Real-Time PCR انجام شد. آزمایش Real-Time PCR با استفاده از کیت Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG شرکت Invitrogen بر طبق دستورالعمل مربوطه انجام شد. بطور خلاصه هر واکنش شامل یک میکرولیتر cDNA، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد (10 μM)، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس (Universal Revers primer) (10 μM)، ۲۵ میکرولیتر SYBR mix و ۲۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. برای خارج کردن حباب‌های هوا از درون میکروتیوب‌ها، پلیت حاوی آن‌ها به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰×g سانتریفیوژ شد.

۱٪ آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، استرپتومایسین و آمفوتریپسین B بود در ۳۷ درجه سلسیوس، رطوبت ۹۰٪ و دی اکسیدکربن ۵٪ کشت داده شدند. پس از همپوشانی سلول‌ها به حدود ۸۰٪، سلول‌ها با تریپسین جمع‌آوری و پس از شستشو، در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با غلظت  $3 \times 10^5$  کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، به منظور تیمار سلول‌ها با وینکریستین، محیط کشت با محیط حاوی وینکریستین با غلظت‌های مختلف (۰/۰۵۰ تا ۵۰ میکرومول) جایگزین شد. محیط کشت سلول‌های گروه کنترل تنها حاوی دی متیل سولفاکساید (DMSO) بود. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، سلول‌های گروه‌های آزمایش و کنترل با PBS شستشو و محلول MTT برای مدت ۴ ساعت به آن‌ها اضافه شد. پس از آن کریستال‌های رنگی ایجاد شده را با DMSO حل کرده و میزان رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت الیزا مورد بررسی قرار گرفت. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

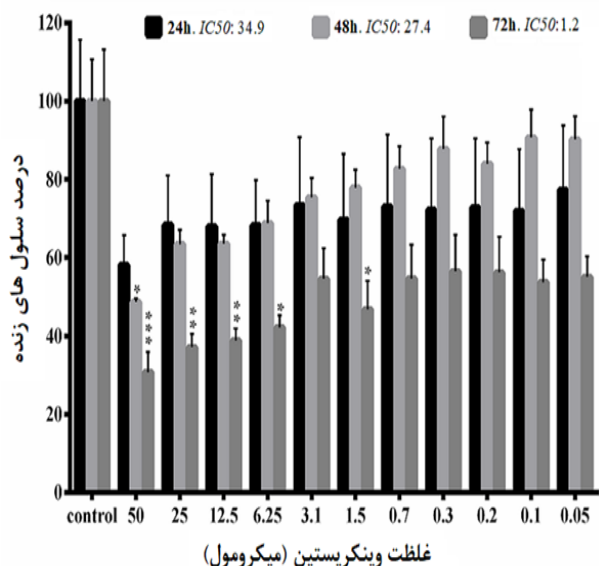
ب) تعیین سلول‌های آپوپتوتیک به وسیله تکنیک فلوسیتومتری: برای تعیین میزان آپوپتوز سلولی، سلول‌های رده CO 88BV59-1 در پلیت‌های ۲۴ خانه با غلظت  $3 \times 10^5$  کشت داده شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت، محیط کشت اولیه با محیط کشت حاوی وینکریستین متناسب با IC50 زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جایگزین شد و در گروه کنترل نیز تنها DMSO وجود داشت. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، تمام سلول‌ها با استفاده از تریپسین جمع‌آوری و با محلول PBS شستشو داده شدند و سپس با Annexin-V و PI رنگ آمیزی انجام شد و سلول‌های آپوپتوتیک با دستگاه فلوسیتومتری FACScan™ شمارش شدند. در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin را گرفتند و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شدند و دیواره سلولی آن‌ها اندکی نفوذ پذیر شده با دو رنگ Annexin و PI رنگ شده و سلول‌های نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند.

ج) تعیین میزان بیان mi-RNA با استفاده از تکنیک Real-Time RT-PCR: پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از

داده‌ها بصورت  $mean \pm SD$  نمایش داده شده است. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون واریانس یکطرفه ANNOVA انجام شد و در تمام آزمون‌ها سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

**الف) بررسی میزان سلول‌های زنده با استفاده از MTT:** وینکریستین بصورت وابسته به دوز و وابسته به زمان میزان زنده‌مانی رده سلولی را کاهش داد. با افزایش غلظت وینکریستین درصد بقای سلولی کاهش یافت به طوری که کمترین زنده‌مانی سلولی در غلظت ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میکرومول و در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد ( $P < 0/001$ ) (شکل ۱). میزان  $IC_{50}$  در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون به ترتیب برابر  $34.9 \mu M$ ،  $27.4 \mu M$  و  $1.2 \mu M$  بدست آمد (شکل ۱).



شکل ۱: تاثیر وینکریستین بر زنده‌مانی رده سلولی.

**ب) نتایج میزان آپوپتوز سلولی با تکنیک فلوسایتومتری:** میزان تاثیر وینکریستین بر آپوپتوز بر رده سلولی CO 88BV59-1 LCL، با توجه به مقادیر  $IC_{50}$  به دست آمده در آزمایش MTT، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۲ نشان داده شده است.

سپس پلیت مذکور برای بررسی واکنش Real-Time PCR تشخیص میزان فلورسنت در دستگاه QIAGEN Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany) قرار داده شد. برنامه دمایی دستگاه بصورت زیر تعیین شد: مرحله اولیه فعال سازی PCR به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس که در آن آنزیم Hot Star Taq DNA پلیمرز فعال می‌شود. مرحله دوره‌ای شامل دناتوراسیون ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال پرایمر ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس و مرحله تکثیر ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس بود، این سیکل به تعداد ۴۰ بار تکرار شد (۱۷). بیان نسبی mi-RNAs با استفاده فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  بصورت زیر محاسبه شدند.

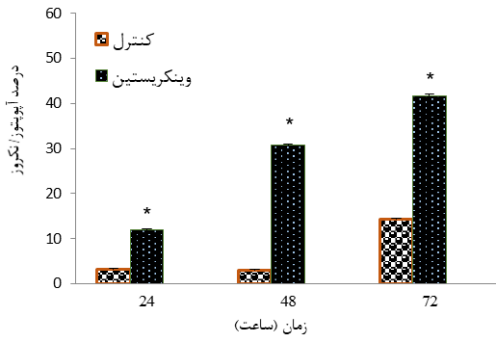
$$\Delta\Delta CT = (Ct(\text{experimental target gene}) - Ct(\text{experimental internal control})) - (Ct(\text{control target gene}) - Ct(\text{control internal control}))$$

در نهایت با روش سایبرگرین، Real-Time RT-PCR انجام و میزان بیان نسبی mi-RNA مورد نظر تعیین شد. از ژن mi-RNA U6 به عنوان کنترل و از cDNA که توسط USTL primer ساخته شد برای بیان mi-RNA U6 استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره ۱ مشخص شده است.

**د) تحلیل آماری:** آزمون‌های مربوط به هر نمونه بصورت سه تایی انجام شد.

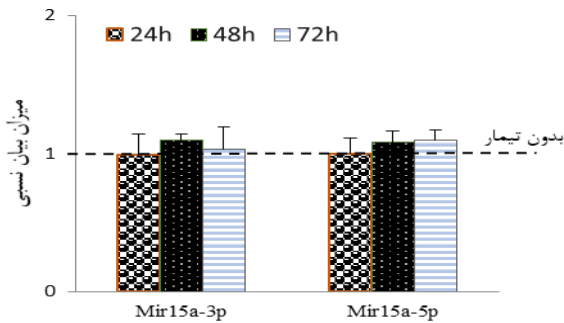
جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده برای hsa-miR-15a (۱۷).

mi-RNA	توالی	(°C)
USTL primer	-5GAAGGCGAGGAGCAGAT	90
	CGAGGAAGAAGACGGAA	
	GAATGTGCGTCTCGCCT	
hsa-miR-15a-3p	TCTTTCNNNNNNNN-3	60
	5-CAGGCCAUUUG	
hsa-miR-15a-3P-F primer	UGCUGCCUCA-3	60
	5-ACACTCCAGCTGGGCAGG	
hsa-miR-15a-5p	CCATATTGTGCTGCCTC-3	....
	5-UAGCAGCACAU	
hsa-miR-15a-5P-F primer	AAUGGUUUGUG-3	60
	5-ACACTCCAGCTGGGTAGC-3	
Universal Revers primer	AGCATAATGTTTGT	59.8
	-5TGGTGTCTGGAGTCG-3	
U6 internal control F primer	-5AACGCTTCACGAATTTGCGT-3	59.1
U6 internal control R primer	-5CTCGCTTCGGCAGCAC-3	59.1



شکل ۳: آنالیز کمی آپوپتوزیس در رده سلولی تیمار شده با وینکریستین (با IC50 مختلف) در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت.

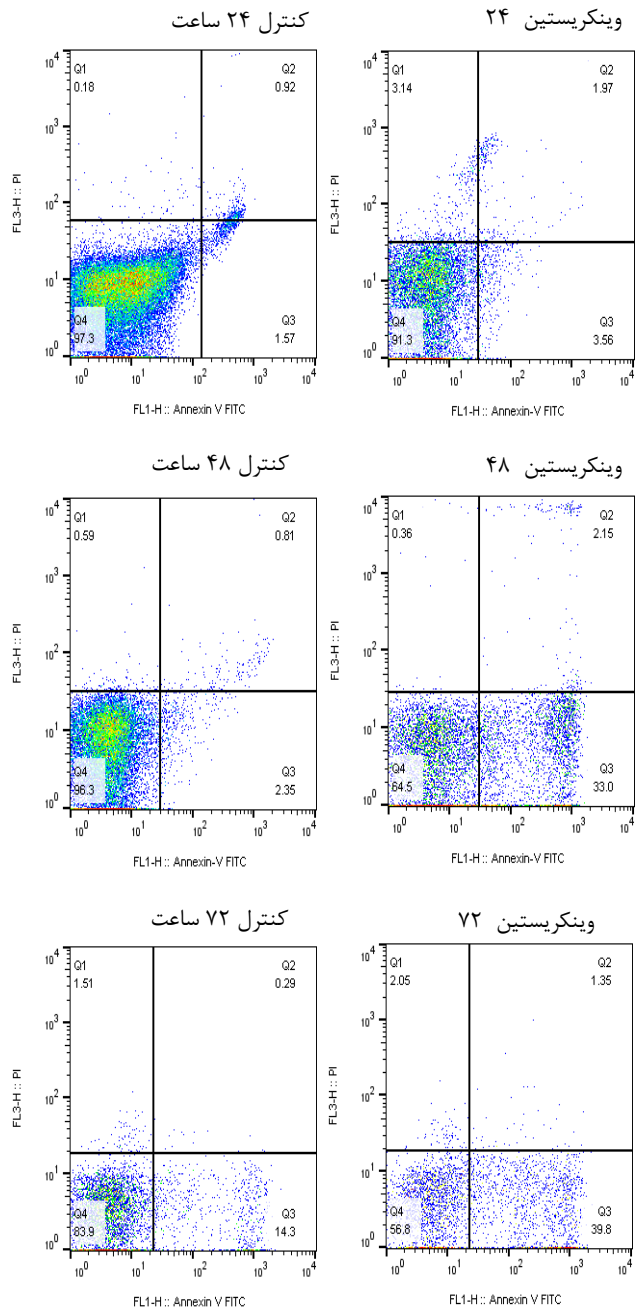
ج) تاثیر وینکریستین بر میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p با استفاده از Real Time-PCR: نتایج نشان داد که میزان بیان نسبی miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در رده سلولی تیمار شده با وینکریستین (با IC50 مختلف) در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول کنترل، تفاوت آماری معنی داری نداشت ( $P > 0.05$ ) (شکل ۴).



شکل ۴: میزان بیان نسبی miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در رده سلولی تیمار شده با وینکریستین (با IC50 مختلف) در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت.

### بحث

در اختلالات لنفوپرولیفراتیو مرتبط با EBV تظاهرات بالینی متفاوت گزارش شده و پاسخ به درمان آن‌ها نیز متفاوت است (۱۹). EBV به واسطه تغییر در بیان miRNAs سلول‌های آلوده باعث نامیرایی و یا سرطانی شدن این سلول‌ها می‌شود (۳). این ویروس باعث کاهش بیان miRNA-15a می‌شود که در نتیجه آن بیان و فعالیت ژن BCL-2 افزایش پیدا کرده که افزایش تکثیر بی رویه سلول‌های توموری (۱۴)، کاهش



شکل ۵: نتایج فلوسیتومتریک نشان دهنده القای آپوپتوزیس در رده سلولی تیمار شده (با وینکریستین با IC50 مختلف) در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت. وینکریستین تاثیر قابل توجهی بر آپوپتوز بر رده سلولی به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان نشان داد ( $P < 0.001$ ). بطوری‌که بیشترین اثر آپوپتوتیک در IC50 برابر  $1.2 \mu\text{M}$  و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی داشت (شکل ۳).

۱۵a می تواند منجر به CLL شود (۲۷). بنابراین miRNA-15a می تواند سرکوب گر تومور باشد. در بیشتر سلول های آلوده به ویروس EBV، به علت کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-15a، تکثیر تومور افزایش می یابد (۱۴). در این مطالعه همچنین میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در سلول های بیمار شده با وینکریستین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در سلول های بیمار شده با وینکریستین تغییر معنی داری در میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در مقایسه با سلول های بیمار نشده وجود ندارد. تاثیر سیتوتوکسیسیته وینکریستین بر سلول های توموری بسیار مطالعه شده است (۲۵ و ۲۶). ولی در مورد تاثیر این دارو بر بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در لنفوم هنوز تحقیقی انجام نشده است.

### نتیجه گیری

داده های حاصل از این مطالعه نشان داد که وینکریستین بصورت وابسته به دوز و زمان باعث آپوپتوز در سلول B ترانسفورم شده با EBV میشود. همچنین یافته های این پژوهش نشان می دهد که اثر ضد تکثیری وینکریستین در لنفوم سلول B آلوده به EBV مستقل از تغییر در بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p می باشد و احتمالاً تاثیر آن به افزایش بیان ژن های پیش-آپوپتوز و یا مهار بیان ژن های ضد-آپوپتوزی مربوط می شود. با توجه به شیوع بالای این ویروس و اختلالات لنفوپرولیفراتیو و استفاده درمانی از وینکریستین و همچنین اثرات جانبی این دارو، مطالعات بیشتر در سطح ژنتیکی به منظور مشخص شدن مکانیسم دقیق عملکرد این دارو بر روی لنفوم و سرطان های دیگر پیشنهاد می شود.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

آپوپتوز و نامیرایی سلول را در پی دارد (۱۵). وینکریستین یکی از دارو هایی است که در درمان اختلالات لنفوپرولیفراتیو استفاده می شود (۱۶ و ۲۰). ولی تا کنون مکانیسم اثر وینکریستین بر روی بیان miRNA-15a در لنفوم آلوده به EBV مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، در این مطالعه اثرات سمیت سلولی و آپوپتوتیک وینکریستین با غلظت های مختلف علیه رده سلولی LCL CO 88BV59-1 که نوعی سلول B تغییر شکل یافته با ویروس EBV است مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که وینکریستین به طور قابل توجهی زنده مانده سلول های رده CO 88BV59-1 LCL را کاهش می دهد. این تاثیر با گزارش های قبلی منتشر شده در مورد خاصیت مهاری وینکریستین و حتی درمانی در برابر سلول های مختلف توموری سازگار است (۱۶ و ۲۰).

آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده یکی از فرآیندهای بیولوژیکی است که توسط ژن ها کنترل می شود و به منظور حذف سلول های نامطلوب در موجودات زنده استفاده می شود (۲۱ و ۲۲). یکی از اثرات دارو های ضد سرطان از جمله وینکریستین، القای آپوپتوز در سلول های سرطانی است (۲۳ و ۲۴).

در این تحقیق همچنین تاثیر وینکریستین بر میزان آپوپتوز رده سلولی مورد نظر بررسی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار رده سلولی CO 88BV59-1 LCL با وینکریستین باعث مهار رشد این رده سلولی به روش وابسته به زمان می شود. این اثر ممکن است به دلیل افزایش بیان ژن های پیش-آپوپتوز و یا مهار بیان ژن های ضد-آپوپتوزی باشد.

نتایج به دست آمده با نتایج مطالعات قبلی که القای آپوپتوز اولیه و تاخیری در سلول های لنفوم بیمار شده با وینکریستین را مورد بررسی قرار داده اند (۲۵ و ۲۶) همخوانی دارد. مطالعات نشان داده اند که miRNA-15a که در لوکوس 13q14 قرار دارد، در اکثر موارد لنفوم های سلول B کاهش بیان داشته یا حذف شده اند. miRNA-15a به عنوان تنظیم کننده منفی پروتئین BCL2 عمل می کند، که این امر می تواند نشان دهنده مکانیسم مولکولی باشد که در نتیجه کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم برای بررسی و تصویب پروژه پژوهشی حاضر و از کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جهرم برای تایید آن تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

### References

1. Cohen JI. Epstein–Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(7):481-92.
2. Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, ten Berge IJ. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplantation direct*. 2016;2(1).
3. Sakamoto K, Sekizuka T, Uehara T, Hishima T, Mine S, Fukumoto H, et al. Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein–Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer medicine*. 2017;6(3):605-18.
4. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:3-14.
5. Lewis BP, Shih I-h, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
6. Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, Deshmukh M. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis. *Genes & development*. 2011;25(2):125-30.
7. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*. 2007;39(3):380.
8. Berindan-Neagoe I, Monroig PdC, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(5):311-36.
9. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(33):12481-6.
10. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, et al. microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(13):20881.



11. Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, et al. miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *International journal of cancer*. 2008;123(2):372-9.
12. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(39):13944-9.
13. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91(9):3379-89.
14. Huang E, Liu R, Chu Y. miRNA-15a/16: as tumor suppressors and more. *Future oncology*. 2015;11(16):2351-63.
15. Fu Q, He C, Mao Z-r. Epstein-Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2013;14(1):8-24.
16. Lanzkowsky P, Lipton JM, Fish JD. *Lanzkowsky's manual of pediatric hematology and oncology*: Academic Press; 2016.
17. Li Y, Liu S, Zhang F, Jiang P, Wu X, Liang Y. Expression of the microRNAs hsa-miR-15a and hsa-miR-16-1 in lens epithelial cells of patients with age-related cataract. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(2):2405.
18. Yang L-h, Wang S-l, Tang L-l, Liu B, Wang L-l, Wang Z-y, et al. Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS One*. 2014;9(12):e115293.
19. Marques-Piubelli ML, Salas YI, Pachas C, Becker-Hecker R, Vega F, Miranda RN. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders and lymphomas: a review. *Pathology*. 2020;52(1):40-52.
20. Igarashi T, Kishi S, Hosono N, Higashi T, Iwao T, Yano R, et al. Population pharmacokinetic model development and exposure–response analysis of vincristine in patients with malignant lymphoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1-11.
21. Hu W, Kavanagh J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The lancet oncology*. 2004;4:721-9.
22. Cockram PE, Kist M, Prakash S, Chen S-H, Wertz IE, Vucic D. Ubiquitination in the regulation of inflammatory cell death and cancer. *Cell Death & Differentiation*. 2021:1-15.
23. Alonso-Castro AJ, Ortiz-Sánchez E, García-Regalado A, Ruiz G, Núñez-Martínez JM, González-Sánchez I, et al. Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(2):476-89.
24. Chen MB, Shen WX, Yang Y, Wu XY, Gu JH, Lu PH. Activation of AMP-activated protein kinase is involved in vincristine-induced cell apoptosis in B16 melanoma cell. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(7):1915-25.

25. Vaisheva F, Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapeutic Agents for Non-Hodgkin Lymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Journal of andrology*. 2007;28(4):578-87.
26. Mohammad RM, Wall NR, Dutcher JA, Al-Katib AM. The addition of bryostatin 1 to cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) chemotherapy improves response in a CHOP-resistant human diffuse large cell lymphoma xenograft model. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(12):4950-6.
27. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia*. 2015;29(5):1004-17.