

مقاله پژوهشی

ارزیابی سطح بیان گیرنده CXCR4 پس از خاموش کردن توسط siRNA در سلول‌های سرطانی MDA-MB-468

معصومه ستاری‌وند^۱، رضا محمدزاده^{۲*}، احمدرضا غلامیان ورنامخواستی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: Rmohammadzadeh82@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1943796.1329

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۹

چکیده

مطالعات بسیاری نشان دادند که siRNAها می‌توانند سبب خاموشی ژن‌های مرتبط با رشد و تهاجم سلول‌های سرطانی گردد. در عین حال؛ اثر دقیق siRNAها بر بیان ژن CXCR4 هنوز به طور کامل به اثبات نرسیده است. براین اساس مطالعه حاضر به ارزیابی سطح بیان گیرنده CXCR4 پس از خاموش کردن توسط siRNA در سلول‌های سرطانی متاستاتیک سینه پرداخته و بررسی‌هایی صورت گرفته است. طی این تحقیق تجربی-آزمایشگاهی سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-468 توسط siRNA اختصاصی ژن snail1 ترانسفکت شدند. جهت سنتز cDNA ابتدا از محیط کشت سلولی، Total RNA استخراج گردید سطح بیان ژن گیرنده CXCR4 توسط qRT-PCR ارزیابی شد. جهت انجام qRT-PCR از PCR panels مخصوص miRNA استفاده شده جهت کنترل داخلی و کالیبراتور داخل پلیت از Unisp6 RNA استفاده شد. تکثیر سلول‌ها به وسیله آزمایش تریپان بلو بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی-تست تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد ناک‌داون ژن snail1 توسط siRNA سبب کاهش معنادار بیان CXCR4 در سلول‌های سرطانی سینه رده MDA-MB-468 شد ($p < 0/05$). طبق نتایج حاصل از این پژوهش، ترانسفکت سلول‌های سرطان سینه توسط siRNA اختصاصی ژن snail1 می‌تواند سطح بیان CXCR4 را کاهش داده و در نتیجه سبب کاهش تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان سینه و به مرور زمان باعث کنترل بیماری گردد.

کلمات کلیدی: CXCR4، siRNA، snail1، سرطان سینه.

مقدمه

سرطان‌زایی مهم‌اند (۲۵). یکی از سرطان‌های بسیار رایج سرطان سینه است. سرطان پستان، به صورت تغییرات رشد خارج از کنترل سلول‌ها در بافت پستان تعریف می‌شود که این رشد غیر طبیعی، در غدد تولید کننده شیر لوبول‌ها یا در مجاری که لوبول‌ها را به نوک پستان مرتبط می‌سازند، ایجاد می‌گردد. درصد

سرطان به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌گردد که مشخصه اصلی آنها، رشد سلولی تنظیم نشده، و تهاجم می‌باشد. توانایی ایجاد پیام‌های رشد خود مختار، فرار از پیام‌های مهارت رشد، گریز از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی، توان همانندسازی نامحدود، رگ‌زایی، تهاجم و متاستاز از عوامل

استفاده از خاموش‌کننده‌های ژن CXCR4 می‌تواند در پیش‌بینی و کنترل سرطان‌هایی همچون کبد، روده، اندومتر، ریه و حنجره نیز مفید واقع شود (۱، ۱۱، ۱۹، ۳۲). با توجه به شیوع گسترده سرطان سینه در دنیا (۲، ۴، ۶، ۲۷) و نیز عوارض بالینی و اجتماعی و اقتصادی این بیماری (۲۰، ۳۰، ۳۳، ۳۷) و نظر به اینکه مطالعات قبلی در خصوص خاموش‌گرها عمدتاً معطوف به اثر آنها روی گیرنده‌ها در سرطان‌های رایجی همچون ریه و کبد و روده انجام شده (۲۱) و تحقیقات محدودی در حوزه اثر آنها روی گیرنده‌های سرطان سینه و بیان ژن‌های مرتبط با آنها به انجام رسیده این تحقیق به ارزیابی سطح بیان گیرنده CXCR4 پس از خاموش کردن توسط siRNA در سلول‌های سرطانی متاستاتیک سینه پرداخته است و نتایج حاصل از این تحقیق اهمیت ویژه‌ای در حوزه سرطان شناسی داشته و می‌تواند در کنترل سرطان سینه موثر باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی رده سلولی سرطانی متاستاتیک سینه (MDA-MB-468) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در تمام مراحل تحقیق توجه به استانداردهای جهانی اصول اخلاقی و پژوهشی رعایت شد.

کشت و شمارش سلول‌های سرطانی: جهت کشت سلول‌ها، از محیط کشت RPMI-1640+10% FBS استفاده شد. سلول‌های دفریز شده به فالكون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰rpm سانتریفوژ گردیدند. رسوب سلولی ته فالكون به فلاسک ۲۵ میلی‌متر مربع حاوی ۱۰-۷ میلی‌لیتر محیط کشت کامل (RPMI1640) حاوی ۱۰ درصد (FBS) منتقل شد و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد دی

شیوع در ایالت متحده و اروپا، دو برابر کشورهای آسیایی است و در همه کشورها، میزان شیوع آن در حال افزایش است. پیشرفت سریع اقتصادی-اجتماعی و تغییرات فرهنگی-اجتماعی، منجر به غربی شدن سبک زندگی و در نتیجه افزایش خطر سرطان پستان در آسیا شده است (۳۴). مطالعات مختلف نشان داده-اند که ژن CXCR4 که سبب تولید گیرنده‌های CXCR4 می‌شود در تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش دارد و می‌توان با استفاده از مهارکننده‌های مولکول CXCR4 از رشد و متاستاز سرطان پستان جلوگیری نمود (۳).

CXCR4 یک پروتئین شبیه رودوپسین است و به صورت انتخابی به CMC chemokine Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1) نیز معروف است متصل می‌شود (۸، ۲۹).

مطالعات نشانگر آند که موش‌هایی که فاقد SDF-1 و CXCR4 هستند فنوتپ تقریباً یکسانی از کشندگی را در اواخر حاملگی نشان می‌دهند (۳۶، ۲۴). همچنین نشان داده شده است که siRNAها از مهار کننده‌های CXCR4 می‌باشند (۱۶) و مکانیسم خاموش‌سازی توسط siRNA شامل سرکوب بیان ژن بعد از رونویسی و تخریب ژن هنگام ترجمه است (۳۱). در واقع خاموشی ژن‌ها اخیراً به عنوان یک تکنیک آزمایشگاهی موفق در تعیین عملکرد و کنترل بیان ژن‌ها به کار می‌رود (۱۳، ۱۴، ۲۷).

تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که کاهش بیان CXCR4 در سطح mRNA با ترکیبی از دو siRNA باعث اختلال در حمله و پیشرفت سلول‌های سرطانی در سلول‌های سرطان پستان می‌شود (۱۰، ۱۷، ۱۸). همچنین تحقیقات به عمل آمده نشان می‌دهند استفاده همزمان از داروهای ضد تومور و siRNAها با کاهش بیان ژن CXCR4 می‌تواند در درمان برخی سرطان‌ها از جمله سرطان تخمدان موثر باشد (۳۵). همچنین

کیت cDNA (Thermofisher Scientific & USA) Synthesis Kit استفاده شد. ابتدا Total RNA رقیق شده و سپس محلول‌های واکنش شامل بافر واکنش آنزیمی و آب بدون نوکلئاز به آن اضافه شده و ۶۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و سپس سریعاً در ۴ درجه سانتیگراد خنک شد.

ارزیابی بیان ژنی: پس از سنتز cDNA بیان ژنی با استفاده از qRT-PCR ارزیابی گردید. جهت انجام qRT-PCR از PCR panels مخصوص miRNA استفاده شده جهت کنترل داخلی و کالیبراتور داخل پلایت از Unisp6 RNA استفاده شد. در مراحل عمل برای ارزیابی بیان نسبی هر ژن ابتدا مخلوطی از مواد مندرج در جدول شماره ۱ تهیه و پس از توزیع ۱۹ میکرولیتر از مخلوط در تیوب‌های مخصوص دستگاه، به هر کدام ۱ میکرولیتر از cDNA اضافه گردید. به عنوان بلانک تیوبی که حاوی تمام مواد موجود در واکنش به جزء cDNA بود مورد استفاده قرار گرفت و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC Water اضافه شد. همه مراحل بر روی یخ انجام شده و جهت جلوگیری از آلودگی در زیر هود لامینار انجام گرفت. سیکل‌های PCR برای تمام ژن‌ها بر اساس پروتکل جدول ۲ انجام شدند. پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار پرایمر ۳ (Primer3) طراحی شدند و به صورت آنلاین در سایت NCBI تایید شد (جدول ۳). در این تحقیق تمام آزمایشات به صورت تریپلیکات انجام گردید. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار Prism GraphPad6 صورت گرفت، میانگین و انحراف معیار توسط آمار توصیفی به دست آمد. برای مقایسه گروه‌ها از آنالیز آماری تی-تست استفاده گردید. سطح معنی‌داری به صورت $p < 0/05$ نظر گرفته شد

اکسید کربن انتقال یافت. پس از کشت، شمارش سلولی، با لام نئوبار انجام گرفت.

تیمار سلولی: در این تحقیق جهت تیمار سلول‌های سرطانی با siRNA اختصاصی، کیت ژن snail1 (Santacruz Biotechnology California, USA) برای گیرنده ژن CXCR4 مورد استفاده قرار گرفت. پس از دریافت کیت، محلول‌های موجود در ۸۰-درجه سانتیگراد ذخیره شدند. مطابق دستورالعمل کیت، از آب بدون RNase برای رقیق کردن استوک اصلی استفاده شد. سلول‌ها به دو گروه کنترل (عدم تیمار) و سلول‌های تیمار شده (ترانسفکت شده با siRNA) تقسیم‌بندی شدند. سلول‌های کنترل و تیمار شده در ابتدا تحت تاثیر دوز ۶۰ siRNA در سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ قرار گرفتند و بعد از بررسی بیان ژن، زمان مؤثر به دست آمد و در نهایت در زمان مؤثر سلول‌ها تحت تاثیر سه دوز ۴۰، ۶۰ و ۸۰ را قرار گرفتند تا دوز مؤثر به دست بیاید. جهت کنترل داخلی از ژن بتا اکتین استفاده شد. در زمان و دوز مؤثر به دست آمده، سلول‌های متاستاتیک MDA-MB-468 قبل و بعد از ترانسفکت ژن اختصاصی مورد نظر، از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی تغییرات مورفولوژی حاصل از تیمار در سلول‌های سرطانی پرداخته شد. برای سنجش قابلیت حیات و رشد سلول‌ها از رنگ آمیزی تریپان بلو و مشاهده با لام نئوبار استفاده شد.

استخراج میکروRNA و سنتز cDNA: جهت سنتز cDNA ابتدا از محیط کشت سلولی Total RNA استخراج گردید. برای این منظور از کیت miRCURY RNA Isolation kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) استفاده شد. مطابق دستورالعمل جهت کنترل کیفی و خلوص Total RNA استخراج شده از Unisp RNA استفاده گردید. پس از استخراج Total RNA، سنتز cDNA انجام گرفت. بدین منظور از

جدول ۱- مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR

مقدار	اجزای واکنش
۱۰ μL	Syber Green PCR Master Mix 2X
۳ μL	Forward Primer (5pmol/ 1μl)
۳ μL	Reverse Primer (5pmol/ 1μl)
۱ μL	cDNA(20ng)
۴ μL	DEPC Treated Water

جدول ۱- پروتکل سیکل‌های به کار برده شده برای انجام Real-Time PCR

Cycle	Cycle Point
Hold step	95 °C, 10 min
Cycling (45 repeats)	Step 1 at 95°C, hold 20 secs
	Step 2 at 59°C, hold 50 secs
	Step 3 at 72°C, hold 20 secs

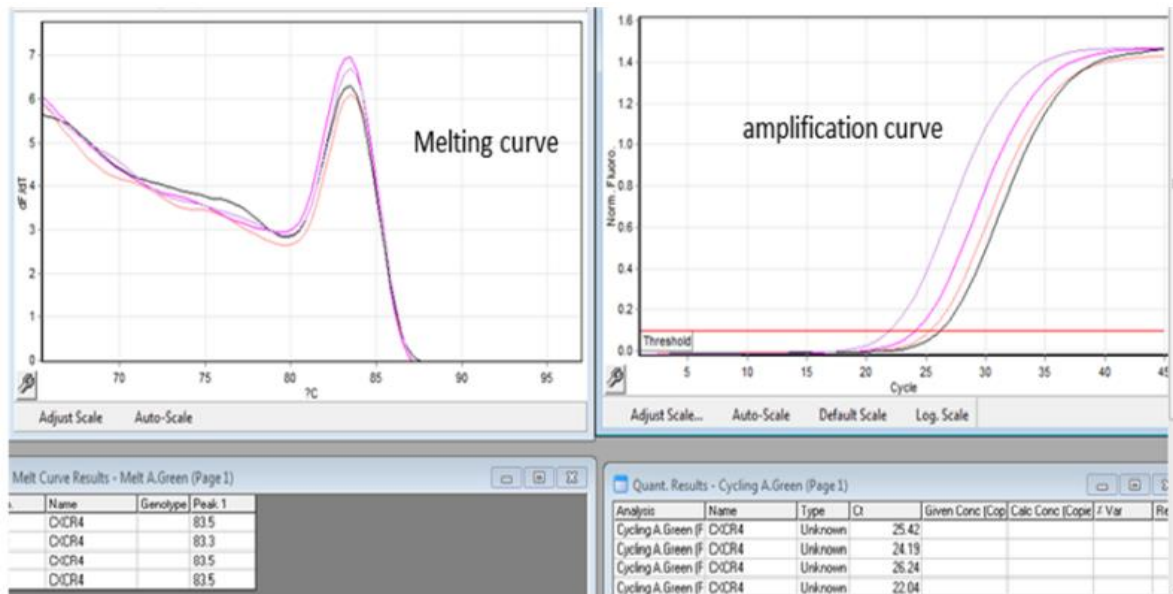
جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای هر ژن در واکنش های Real time PCR

نام ژن	FW/RV	توالی پرایمر
CXCR4	FW	Forward: 5'- ATCCGGCAAACCTGGATCCCTC-3'
	RV	Revers: 5'-AACTCAGTTTGTGGCTGC-3'
β-actin	FW	Forward: 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'
	RV	Revers: 5'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'

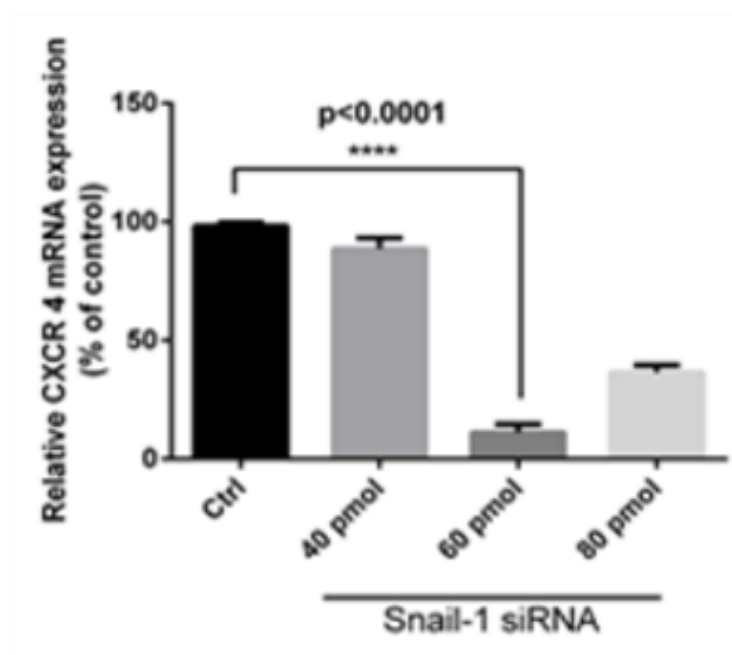
نتایج

دست آید. درصد بیان نسبی mRNA ژن گیرنده CXCR4 بعد از ناک‌داون ژن snail1 برابر ۲۰ درصد بود (نمودار ۱). مورفولوژی سلول‌های متاستاتیک ۴۶۸ MB-MDA در زمان و دوز مؤثر بدست آمده و قبل و بعد از ترانسفکت ژن اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. بعد از ترانسفکت ژن اختصاصی، عدم رشد و آپوپتوز در سلول‌ها مشاهده گردید (شکل ۲).

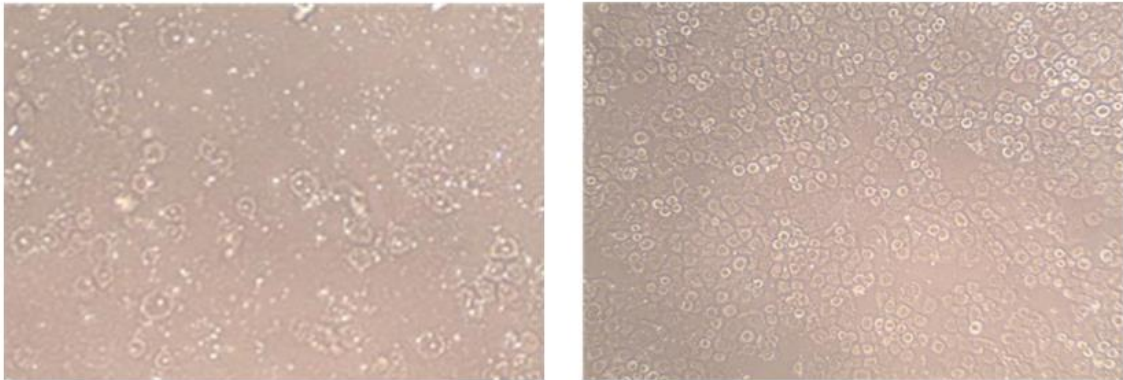
جهت تعیین زمان و دوز مؤثر منحنی آمپلی‌فیکاسیون و ذوب ژن بتا اکتین و ژن CXCR4 به دست آمد (شکل ۱). همان طوری که در نمودار ۱ دیده می‌شود پس از ناک‌داون ژن، snail1 کاهش چشمگیری در بیان گیرنده CXCR4 مشاهده شد. بیان گیرنده CXCR4 در سلول‌های تیمار نشده با siRNA (کنترل) صد در نظر گرفته شد تا درصد نمونه تیمار شده به



شکل ۱- منحنی آمپلی‌فیکاسیون و ذوب ژن گیرنده CXCR4 در نمونه تیمار شده و تیمار نشده با siRNA اختصاصی ژن snail



نمودار ۱- میزان بیان CXCR4 در سلول‌های تیمار شده با siRNA مربوط به ژن snail1 در مقابل سلول‌های تیمار نشده



(ب)

(الف)

شکل ۲- تأثیر siRNA ژن snail1 بر روی شکل ظاهری سلول‌ها در رده سلولی MB-MDA-۴۶۸ سرطان سینه. الف) تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار نشده با siRNA با عدسی ۴۰. ب) تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با siRNA اختصاصی ژن snail1 با عدسی ۴۰

بحث

ژن منجر به مهار تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی گردند (۱۷). همچنین مطالعات دیگر از تأثیر siRNAها بر خاموش سازی بسیاری از ژن‌ها و جلوگیری از بیان ژن‌های درگیر در سلول‌های سرطانی از قبیل سلول‌های سرطانی ریه، کولون، معده و پروستات حکایت دارند و با خاموش سازی ژن‌های مرتبط با تهاجم و متاستاز در این سلول‌ها نقش مهمی در مهار سرطان ایفا می‌نمایند (۵، ۹، ۲۲، ۲۸).

درباره مکانیسم اثر میکروRNAها، تحقیقات ثابت کرده‌اند که ترکیبات siRNA/miRNA همراه با سایر عوامل ضد سرطان برای درمان قابل استفاده می‌باشند (۲۲).

خاموش کردن snail1 توسط siRNA می‌تواند سبب القای آپوپتوز و تغییر بیان میکروRNAها در رده سلولی مثانه گردد و این امر می‌تواند در درمان سرطان مثانه مورد استفاده قرار گیرد (۲۳). از سویی خاموش سازی snail1 توسط siRNA باعث مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی مری از طریق مهار بیان ژن‌های مرتبط با متاستاز می‌شود (۱۲). مطالعات نشان داده‌اند که خاموش کردن XCR4 در سلول‌های سرطانی

نتایج این تحقیق نشان دادند که ناک‌داون ژن snail1 توسط siRNA سبب کاهش معنادار بیان CXCR4 در سلول‌های سرطانی سینه می‌گردد و این امر از نظر کاهش متاستاز در سلول‌های سرطانی سینه و در نتیجه درمان و کنترل سلول‌های سرطانی سینه اهمیت خاصی دارد. در واقع نتایج حاصل از مطالعه‌ی انجام گرفته در خصوص سرطان سینه، پیشرفت سریع اقتصادی- اجتماعی و تغییرات فرهنگی- اجتماعی منجر به غربی شدن سبک زندگی و در نتیجه افزایش خطر سرطان پستان در آسیا و دیگر نقاط دنیا را نشان می‌دهد (۳۴) از این منظر مطالعه در خصوص پیشگیری از این سرطان بسیار حایز اهمیت است. از طرفی CXCR4 به عنوان مهمترین ژن محافظت شده در تنظیم شناخته می‌شود و نقش مهمی در متاستاز سلول‌های سرطانی ایفا می‌نماید به گونه‌ای که کاهش بیان آن می‌تواند سبب کاهش قابل ملاحظه در پتانسیل متاستازی سلول‌های سرطانی گردد (۳). همچنین مطالعات اخیر نشان داده‌اند که siRNAها نقش مهمی در کنترل و بیان ژن CXCR4 دارند به طوری که قادرند سبب خاموشی آن شده و با خاموش سازی این

منابع

1. Abedini, F., Ismail, M., Hosseinkhani, H., Ibrahim T. A. T., Omar A. R., Chong P. P., Domb A. J. 2011. Effects of CXCR4 siRNA/dextran-spermine nanoparticles on CXCR4 expression and serum LDH levels in a mouse model of colorectal cancer metastasis to the liver. *Cancer Management and Research*, 3: 301-309.
2. Altioik, N., Ersoz, M., Koyuturk M. 2011. Estradiol induces JNK-dependent apoptosis in glioblastoma cells. *Oncology Letters*, 2(6): 1281-1285
3. Bagheri M., Fazli M., Saeednia S., Kharanagh M.G., Ahmadiankia N. 2020. Sulforaphane modulates cell migration and expression of β -catenin and epithelial mesenchymal transition markers in breast cancer cells. *Iranian Journal of Public Health*, 49(1): 77. [in Persian]
4. Carlson R.W., Allred D. C., Anderson B. O., Burstein H. J., Carter W. B., Edge S. B., Zellars R. 2011. Invasive breast cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9(2): 136-222.
5. Charbgo F., Behmanesh M., Mohebbi S., Shirvani Farsani Z. 2014. RNA Nanotechnology in Gene Therapy of Lung Cancer. *Nafas Journal*, 1(2): 1-9.
6. Crivellari D., Aapro M., Leonard R., Von Minckwitz G., Brain E., Goldhirsch A., Muss H. 2007. Breast cancer in the elderly. *Journal of Clinical Oncology*, 25(14): 1882-1890.
7. Davudian S., Shajari N., Kazemi T., Mansoori B., Salehi S., Mohammadi A., Baradaran B. 2016. BACH1 silencing by siRNA inhibits migration of HT-29 colon cancer cells through reduction of metastasis-related genes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84: 191-198.
8. Fredriksson R., Lagerström M.C., Lundin L.G., Schiöth H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups

مغزی می‌تواند در کاهش قدرت متاستازی نقش مهمی ایفا نماید (۳۸). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که خاموش کردن ژن BACH1 توسط siRNA می‌تواند سبب کاهش بیان ژن CXCR4 شده و در نتیجه سبب کاهش متاستاز در سلول‌های سرطانی کولون گردد (۷).

با توجه به اینکه مکانیسم اثر siRNAها اساساً شامل سرکوب بیان ژن بعد از رونویسی و تخریب ژن هنگام ترجمه است (۳۱)؛ بنابراین، احتمالاً در مطالعه‌ی حاضر نیز siRNA با تاثیر بر این مسیرها سبب کاهش بیان CXCR4 در سلول‌های سرطانی سینه شده است. این تحقیق در محدوده‌ی بررسی اثرات siRNA بر سطح بیان ژن CXCR4 در سلول‌های متاستاتیک سرطان سینه انجام گرفته و از نظر بررسی سایر ژن‌های مرتبط به دلیل محدودیت پشتیبانی مالی، دارای محدودیت‌هایی می‌باشد. محققین این طرح امیدوارند در ادامه‌ی این پژوهش امکان مطالعه در خصوص بررسی بیشتر مارکرهای تشخیصی فراهم آید.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند که ترانسفکت سلول‌های سرطان سینه توسط siRNA اختصاصی ژن snail1 می‌تواند سطح بیان CXCR4 را کاهش داده و با توجه به اثرات CXCR4 در تکثیر و متاستاز، سبب کاهش تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان سینه گردد.

تشکر و قدردانی

بخشی از این پژوهش با حمایت مالی شبکه جهانی تحقیقات، آموزش و رخدادهای (GREEN) اجرا شده، بدین وسیله از تمامی کسانی که در اجرای این تحقیق یاریگر محققان این پژوهش بوده‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

16. Liang Z., Yoon Y., Votaw J., Goodman, M. M., Williams L., Shim H. 2005. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer research*, 65(3): 967-971.
17. Li Q., Ma R., Zhang M. 2018. CoCl₂ increases the expression of hypoxic markers HIF-1 α VEGF and CXCR4 in breast cancer MCF-7 cells. *Oncology letters*, 15(1): 1119-1124.
18. Lapteva N., Yang A. G., Sanders D. E., Strube R. W., Chen S. Y. 2005. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer gene therapy*, 12(1): 84-89.
19. Li Z., Chen G., Ding L., Wang Y., Zhu C., Wang K., Oupicky D. 2019. Increased survival by pulmonary treatment of established lung metastases with dual STAT3/CXCR4 inhibition by siRNA nanoemulsions. *Molecular Therapy*, 27(12): 2100-2110.
20. Liu J., Sareddy G. R., Zhou M., Viswanadhappalli S., Li X., Lai Z., Vadlamudi R. K. (2018). Differential effects of estrogen receptor β isoforms on glioblastoma progression. *Cancer research*, 78(12): 3176-3189.
21. Leslie K. K., Keefe D., Powlll S., Naftolin F. 1994. Estrogen receptors are identified in the glioblastoma cell line UI38MG. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation JSIGI*, 1(3): 238-244.
22. Moosavi M. A., Seyed Gogani N., Asvadi Kermani I., Asadi M. 2012. Nucleostemin gene silencing by siRNA and growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis induction of K562 leukemia cell line. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 14(6): 104-116.
23. Musavi Shenan S. M. H., Mansoori B., Mohammadi A., Salehi S., Kaffash B., Talebi B., Baradaran B. 2017. siRNA mediated silencing of Snail-1 induces apoptosis and alters microRNA expression in human urinary bladder cancer cell line. and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6): 1256-1272.
9. Fathi M., Taghikhani M., Ghannadi Maragheh, M., Yavari K. 2012. Lutetium labeled-siRNA Delivery into Colon Cancer Cells Using Liposomes: A Comparative Study. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 2(6): 17-25.
10. Guo P., You J.O., Yang J., Jia D., Moses M.A., Auguste, D.T. 2014. Inhibiting metastatic breast cancer cell migration via the synergy of targeted, pH-triggered siRNA delivery and chemokine axis blockade. *Molecular pharmaceuticals*, 11(3): 755-765.
11. Huang Y., Ye Y., Long P., Zhao S., Zhang, L. 2017. Silencing of CXCR4 and CXCR7 expression by RNA interference suppresses human endometrial carcinoma growth in vivo. *American journal of translational research*, 9(4): 1896.
- 12 Hemmatzadeh M., Mohammadi H., Babaie F., Yousefi M., Ebrazeh M., Mansoori B., Baradaran B. 2018. Snail-1 silencing by siRNA inhibits migration of TE-8 esophageal cancer cells through downregulation of metastasis-related genes. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 8(3): 437.
13. Khalilian S., Kheyri H., Hojjati Z. 2020. Small interfering RNA principles applications and challenges. *Laboratory and Diagnosis*, 12(47): 62-69.
14. Khajouee Ravari S., Baradaran B. 2016. Apoptotic Effect of Specific siRNA against HMGA2 on PC3 Prostate Adenocarcinoma Cell Line. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 16(2): 159-168.
15. Luker K. E., Lewin S. A., Mihalko L. A., Schmidt B. T., Winkler J. S., Coggins N. L., Luker G. D. 2012. Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene*, 31(45):4750-4758.

31. Tatiparti K., Sau S., Kashaw S. K., Iyer A. K. 2017. siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*, 7(4):77.
32. Ullah A., Chen G., Hussain A., Khan H., Abbas A., Zhou Z., Liu D. 2021. Cyclam-Modified Polyethyleneimine for Simultaneous TGF β siRNA Delivery and CXCR4 Inhibition for the Treatment of CC14-Induced Liver Fibrosis. *International Journal of Nanomedicine*, 16: 4451
33. Verheijen F. M., Donker G. H., Viera C. S., Sprong M., Jacobs H. M., Blaauw G., Blankenstein M. A. 2002. Progesterone receptor, bcl-2 and bax expression in meningiomas. *Journal of neuro-oncology*, 56(1): 35-41.
34. Waks A. G., Winer E. P. 2019. Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3): 288-300.
35. Yin W., Qian S. 2021. CD44v6-O-MWNTS-loaded gemcitabine and CXCR4 siRNA improves the anti-tumor effectiveness of ovarian cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9: 1384.
36. Zou Y. R., Kottmann A. H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D. R. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393(6685): 595-599.
37. Zhou M., Sareddy G. R., Li M., Liu J., Luo Y., Venkata P. P., Vadlamudi R. K. 2019. Estrogen receptor beta enhances chemotherapy response of GBM cells by down regulating DNA damage response pathways. *Scientific reports*, 9(1): 1-10.
38. Zhu Y., Yang P., Wang Q., Hu J., Xue J., Li G., Wang D. 2013. The Effect of CXCR4 Silencing on Epithelial-Mesenchymal Transition Related Genes in Glioma U87 Cells. *The Anatomical Record*, 296(12): 1850-1856.
- Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 45(5): 969-974.
24. Nagasawa T., Hirota S., Tachibana K., Takakura N., Nishikawa S. I., Kitamura Y., Kishimoto T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXCL12 chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382(6592): 635-638.
25. Pecorino L. 2016. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford University Press USA.
26. Perillo B., Sasso A., Abbondanza C., Palumbo G. 2000. 17 β -Estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Molecular and cellular biology*, 20(8): 2890-2901.
27. Qureshi A., Tantray V. G., Kirmani A. R Ahangar A. G. 2018. A review on current status of antiviral siRNA. *Reviews in Medical Virology*, 28(4): e1976.
28. Shokrzadeh M., CharkhtabMoghaddam J., NasriNasrabadi N., Najafi M. 2018. Effects of Silencing of Humanin on Cell Fate and Tumor Cell Responses to Etoposide in AGS Cell Line. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 27(156): 1-19.
29. Simon J. A., Archer D. F., Constantine G. D., Pickar J. H., Amadio J. M., Bernick B., Mirkin S. 2017. A vaginal estradiol softgel capsule, TX-004HR, has negligible to very low systemic absorption of estradiol efficacy and pharmacokinetic data review. *Maturitas*, 99: 51-58.
30. Sareddy G. R., Li X., Liu J., Viswanadhapalli S., Garcia L., Gruslova A., Vadlamudi R. K. 2016. Selective estrogen receptor β agonist LY500307 as a novel therapeutic agent for glioblastoma. *Scientific reports*, 6(1): 1-13.

Evaluating the Level of Expression of CXCR4 Receiver after Silencing by siRNA in MDA-MB-468 Cancer Cells

Masoumeh Sattarivand¹, Reza Mohammadzadeh^{2*}, Ahmadreza Gholamian Varnamkhasti³

1-Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

2-Department of Biology, Maragheh University, Maragheh, Iran

3-Department Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University, Iran

Abstract

Many studies have shown that siRNAs can silent the genes involved in growth and invasion of cancer cells. However, the exact effect of siRNAs is not entirely clear on the expression of CXCR4 gene in breast cancer cells. Therefore, the present study evaluated the expression of CXCR4 gene after silencing the siRNA in metastatic breast cancer cells. In this experimental-laboratory study, MDA-MB-468 breast cancer cells were transfected by the specific siRNA of the snail1 gene. The expression levels of CXCR4 gene were evaluated by qRT-PCR. Cell proliferation was assessed by trypan blue test. Data was analyzed using t-test. Snail1 knockdown by siRNA significantly reduced the expression level of CXCR4 in MDA-MB-468 breast cancer cells ($P < 0.05$). The results of this study showed that the transfection of breast cancer cells by the specific siRNA of snail1 gene can reduce the expression level of CXCR4 and thus reduce the proliferation and invasion of breast cancer cells.

Keywords: Snail1, CXCR4, breast cancer.