



مطالعه تاثیر بی وزنی بر روی بیان ژن های TIMP1, MMP23 MMP27, MMP8, MMP1 در لاین سلولی

سرطان سینه

الناز رضایی دولت آباد

کارشناس ارشد ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
جاذبه از مهم ترین نیروهای وارده بر موجودات زنده روی زمین است که در طول حیات، بر سلول ها، مولکول ها و در نتیجه بر کل ارگانیسم تاثیرگذار است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر بی وزنی شبیه سازی شده بر تغییرات بیان ژن های TIMP1, MMP23, MMP8, MMP27 و TIMP1 در رده های سلولی به نام های ZR75, BT20, MDA-MB468, MCF-7 سرطان سینه می باشد. به منظور اعمال بی وزنی، سلول های سرطانی، به مدت یک روز و سه روز بر روی دستگاه کلینواست قرار گرفتند و برای بررسی میزان زنده بودن سلول ها و بررسی فعالیت متابولیسمی از تست MTT و بررسی آپوپتوز و یکسری تغییرات در سطح سلول و غشای پلاسمایی کیت انکسین استفاده شد و سپس RNA از سلول ها استخراج و تغییرات بی وزنی توسط Real Time PCR سنجش گردید. یافته ها نشان دادند که بی وزنی به مدت یک روز، سطح بیان ژن TIMP1, MMP23, MMP1 را کاهش داده اما با ادامه اعمال بی وزنی تا سه روز، بیان به سطح کنترل بازگشته است. با بهینه سازی مدت زمان تیمار بی وزنی احتمالاً شاهد تغییرات قابل توجه در بیان ژن های بوده تا از این طریق بتوان گام هایی را در کشف مکانیسم های درگیر در سرطان و درمان آن برداشت.	تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷ چاپ: پاییز ۱۴۰۴ DOI: doi.org/10.82415/NACMS.1404.1225280 کلمات کلیدی: بی وزنی، سلول سرطان پستان، Real Time PCR، کلینواست، MMP * نویسنده مسئول: Email re.elnaz1361@gmail.com

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین نوع بدخیمیدر زنان است و شیوع آن در زنان رو به افزایش بوده و حدود ۲/۳ میلیون مورد جدید زن مبتلا به سرطان پستان در سال ۲۰۲۰ در جهان شناسایی شد که از این تعداد حدود ۶۸۵۰۰۰ نفر فوت شدند(۱). کشورهای در حال توسعه از محدودیت‌های اقتصادی و زیرساختی رنج می‌برند که دستیابی به هدف افزایش بقای بیماران سرطان پستان از طریق تشخیص و درمان سریع را دشوار می‌کند(۲). متاستاز و تهاجم سلول‌های تومور پستان مسئول بسیاری از مرگ‌های ناشی از سرطان پستان هستند متاستاز شامل مهاجرت سلول‌های سرطانی از بافت تومور اولیه به بافت دیگری از بدن است این فرآیند یک عامل اساسی در پیش‌آگهی بالینی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان پستان است(۳). نرخ بقای پنج ساله برای سرطان پستان از نزدیک به ۱۰۰ درصد زمانی که سرطان موضعی باشد به کمتر از ۲۵ درصد زمانی که سرطان به نقاط دوردست نفوذ کرده باشد کاهش می‌یابد. این امر اهمیت شناسایی و واسطه‌های هدف در فرآیند متاستاز را نشان می‌دهد. تقریباً یک سوم از بیماران با سرطان پستان به هنگام تشخیص اولیه از نظر متاستاز مثبت هستند. تبدیل از فنوتیپ غیر بدخیم به فنوتیپ متاستاتیک یک فرآیند تکاملی است که در آن سلول‌های سرطانی ویژگی‌هایی به دست می‌آورند که از یک زیرجمعیت سلولی ناشی می‌شوند و در نهایت قادر به

تکمیل تمام مراحل آبشار متاستاتیک هستند (۴). تخریب و بازسازی ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی در مهاجرت و متاستاز سلول‌های تومور ایفا می‌کند (۵). روش‌های مختلفی برای درمان در افراد مبتلا به سرطان استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، درمان هدفمند، جراحی، هورمون درمانی و پرتودرمانی اشاره کرد. بروز سرطان، مقاومت دارویی و اثرات سمی روی اندام‌های غیرهدف، همگی از معایب مهم شیمی درمانی و سایر تکنیک‌های درمانی هستند که ممکن است استفاده از داروهای ضد سرطان را محدود کرده و در نتیجه کیفیت زندگی بیمار را کاهش دهد (۶). پیگیری داروهای ضد سرطان بالقوه جدید با عملکرد بهبود یافته و روش‌ها و استراتژی‌های جدید با عوارض جانبی کمتر برای حل مشکلات درمان‌های فعلی از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر مشخص شده است که محیط بی‌وزنی شبیه سازی شده موجب تغییرات سلولی از جمله تغییر در اسکلت سلولی و مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود. بی‌وزنی شبیه سازی شده می‌تواند چسبندگی سلول‌های توموری، تکثیر، تهاجم و متاستاز آن‌ها را نیز تغییر دهد(۷-۱۰). با این وجود، مکانیسم‌های مولکولی که منجر به این تغییرات می‌گردد هنوز به درستی شناسایی نشده‌اند. همچنین مطالعه‌ای در محیط بی‌وزنی شبیه سازی شده با دستگاه کلینواست نشان داد که بی‌وزنی منجر به کاهش تکثیر و چسبندگی و تهاجم سلول‌های

سرطانی ملانوما در محیط *in vitro* و کاهش متاستاز آن‌ها به ریه در شرایط *in vivo* می‌گردد (۱۱). بنابراین، مطالعه سلول‌های سرطانی در محیط بی‌وزنی می‌تواند به ما در شناخت و درک مکانیسم‌هایی که منجر به ایجاد سرطان و پیشرفت آن می‌شود، کمک کند. هم‌چنین این مطالعات می‌تواند موجب توسعه روش‌های درمانی جدید برای درمان سرطان شود. از آنجا که قرارگیری در شرایط بی‌وزنی واقعی پرهزینه و مشکل است، در اکثر مطالعات از دستگاه‌های شبیه‌ساز بی‌وزنی استفاده می‌کنند؛ لذا این مطالعه با هدف بررسی تاثیر بی‌وزنی بر روی بیان ژن‌های شده با دستگاه کلینواست در رده سلول‌های BT20، MCF7، ZR75/1، و MIDB468 انجام شد.

روش کار

مطالعه حاضر در آزمایشگاه زیست - پزشکی فضایی در پژوهشگاه هوافضا به انجام رسیده است. رده‌های سلولی 7-MCF7، BT20، ZR75/1 و MDA-MB468 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، خریداری شد کشت سلولی سلول‌ها در فلاسک T ۲۵ حاوی محیط کشت حاوی محلول همراه با 7/3 g/l بیکرنات سدیم کامل شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین کشت داده‌شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO2 و ۹۰ درصد رطوبت قرار گرفت. 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 - ۲۵ EDTA درصد از کف فلاسک جدا شده و در ۱۰۰ pm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند بخشی از آن به فلاسک‌های جدید منتقل شده و مابقی فریز شدند

مراحل آماده سازی تست MTT

برای بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها و یا بررسی فعالیت متابولیسمی سلول‌ها از کیت MTT شرکت ATOCEL و شماره Catno: ABM21-P1 استفاده شد. بدین صورت که ابتدا کشت دادن ۵۰ هزار سلول در هر چاهک ۹۶ خانه و سپس پودر MTT که ۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود را حل کرده و با محلول حاصل فیلتر گردید و سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی قرار گرفت و بعد از ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک و بعد از مخلوط شدن به مدت ۳ تا ۴ ساعت نمونه‌ها در انکوباتور قرار داده شدند.

بررسی آپوپتوز با کیت انکسین

سلول‌هایی که آپاپتوز کرده اند با کیت انکسین بررسی شد. بدین ترتیب که سلول‌ها با حدود ۳۰۰ گرم برای ۵ تا ۱۰ دقیقه جمع آوری شد و بعد از شستشو با PBS سرد اضافه کردن بافر و آماده کردن انکسین در دستگاه فلو سائتومتری قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز DNA

ابتدا کلینو استت توسط اتانل ۷۰ و اشعه UV استریل شده و داخل انکوباتور کشت سلولی قرار گرفت. سپس تعداد ۲×۱۰ سلول به درون لوله‌های کشتسلول 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 ۲۰rpm تنظیم گردید و در دو تست جداگانه نمونه‌های اصلی تحت تیمار بی وزنی و کنترل تحت نیروی جاذبه ۱ (جی) به مدت ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت کشت داده شدند برای هر تست سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از تیمار بی وزنی به منظور بررسی برخی تغییرات ژنتیکی رخ داده در سلول‌ها از تمامی لوله‌های تست و کنترل RNA 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 ۱۲۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ شده و پس از دور ریختن محلول رویی یک میلی لیتر 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 ۲۰۰۱ کلروفرم به هر میکروتیوب افزوده و پس از مخلوط شدن در دمای ۴ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵

دقیقه با دور ۱۰۰۰ و در دمای ۴ سانتیفریوژ 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 انکو باسیون بر روی یخ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰rpm و در دمای ۴ سانتیفریوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شده و اتانل ۷۵ درصد بر روی رسوب ریخته شد و پس از ورتکسی کوتاه ۸ دقیقه با دور ۷۵۰rpm و دمای ۴ سانتیفریوژ شد. پس از خشک شدن میکروتیوب‌ها میزان ۵۰۱ آب عاری از RNase به هر تیوب افزوده شد و در دمای ۶۰-۵۵ 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 سانتی گراد قرار گرفتند.

استخراج RNA

بعد از مراحل استخراج RNA از سلول‌ها برای اطمینان از صحت استخراج باید cDNA ساخته شده و PCR برای ژن کنترل داخلی گذاشته شود. سپس واکنش رونویسی معکوس که در آن غلظتی از RNA کل که برای سنتز رشته اول cDNA استفاده می شود می تواند از ۱ تا ۵ میکروگرم متغیر باشد که در این پژوهش ۲ میکرولیتر از محلول لیز سلولی آماده شده توسط کیت استخراج تاکارا جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

انجام واکنش Real-Time PCR

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس به منظور تکثیر قطعه مورد نظر واکنش PCR روی محصول RT انجام گرفت که برای این کار از کیت شرکت Amplicon استفاده شد و بعد طراحی پرایمر صورت گرفت و پرایمرها پس از ساخته شدن بصورت لیو فیلیزه دریافت شدند. بعد از روش های انجام PCR و الکتروفورز ژل آگارز و تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ژل آگارز سپس رنگ آمیزی ژل با رنگ DNA Safe Green و عکس برداری از ژل آگارز روشهای تعیین کمی mRNA واکنش Real-Time PCR به روش SYBER Green انجام شد. به علت پیچیدگی انجام Real-Time PCR و به منظور جلوگیری از هرگونه خطایی قبل از هر کار باید ابتدا برنامه انجام کار مشخص باشد و به طور دقیق معین شود که در هر چاهک از چاهک های های هشت گانه کدام cDNA و کدام پرایمر قرار است استفاده گردد که ما برای انجام این بعد از تعیین برنامه کار حروف اختصاصی دلخواه برای ژن های مورد نظر در دستگاه ABI 7500 Real-Time PCR ثبت گردید تا در نهایت یک طرح از چاهک ها توسط نرم افزار ارائه گردد. و سپس تعیین efficiency پرایمر ها صورت پذیرفت و از آن جا که روش به

کار گرفته شده در این تحقیق مقایسه ای و بر اساس ΔCt بود efficiency پرایمرها ۱ در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری داده ها

پس از تعیین Cycle threshold برای هر نمونه با بررسی میزان فلورسانت خوانده شده توسط دستگاه برای هر نمونه، Ct های ژن رفرانس و ژن هدف تعیین شد. تجزیه و تحلیل یافته های حاصل از سنجش های کمی (Real-Time) با استفاده از نرم افزار REST2009 انجام شد.

بررسی بیان ژن های ماتریکس متالوپروتئیناز بعد از یک روز بی وزنی

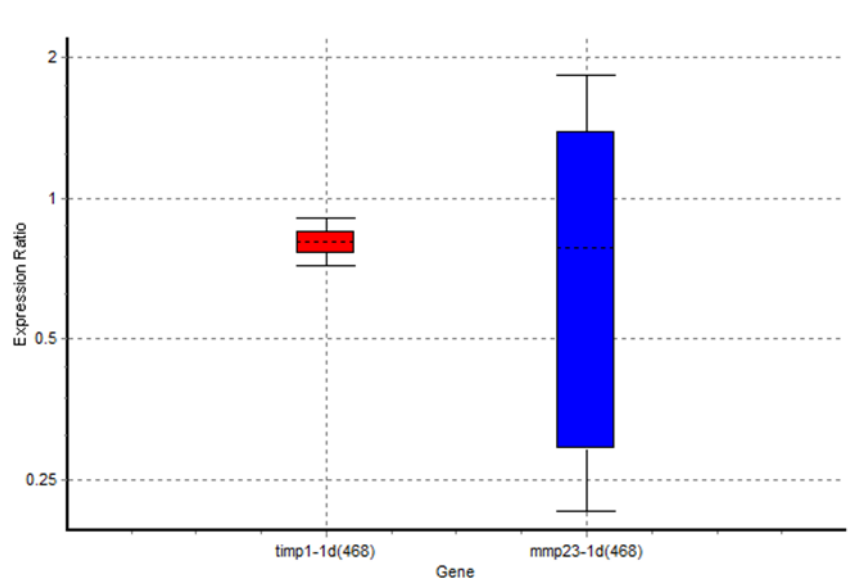
بیان ژن های ماتریکس متالوپروتئیناز در رده سلولی ۴۶۸ بعد از یک روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و نمودار ۱ مشخص است بی وزنی تأثیری بر بیان ژن TIMP1 بعد از یک روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$). ولی بی وزنی منجر به کاهش معنی دار ($P \leq 0/05$) در بیان ژن MMP23 در رده سلولی ۴۶۸ بعد از یک روز بی وزنی شده است.

جدول ۱: بیان ژن های TIMP1 و MMP23 در رده سلولی ۴۶۸ بعد از یک روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-1d(468)	REF	1.0	1.000				
timp1-1d(468)	TRG	1.0	0.807	0.744 - 0.876	0.721 - 0.903	0.154	

mmp23-1d(468)	TRG	1.0	0.626	0.262 - 1.551	0.222 - 1.784	0.834
---------------	-----	-----	-------	---------------	---------------	-------



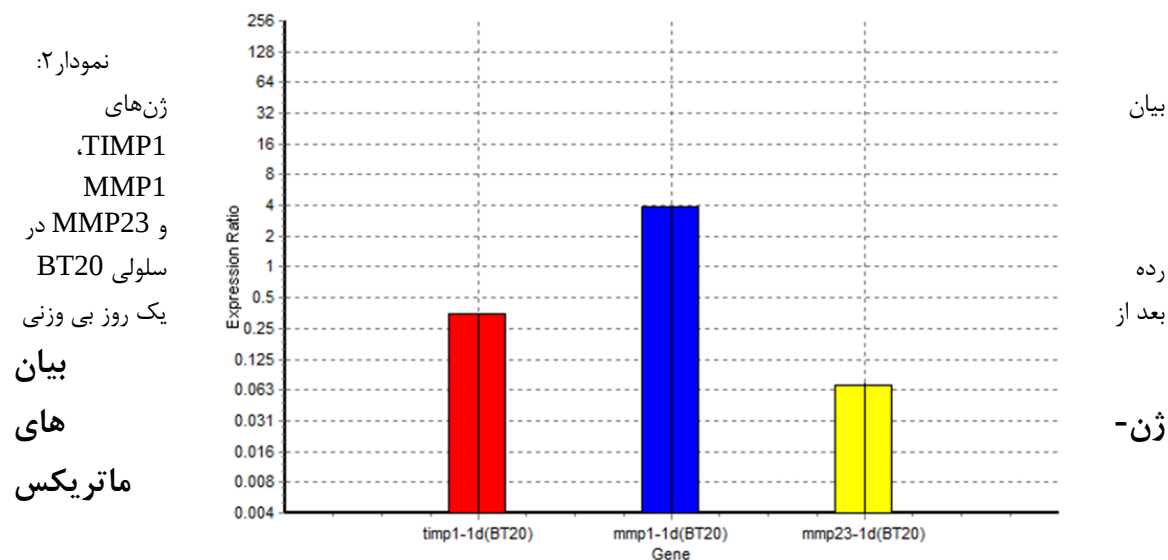
نمودار ۱: بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 در رده سلولی ۴۶۸ بعد از یک روز بی وزنی

بیان ژنهای ماتریکس متالوپروتئیناز در رده سلولی BT20 بعد از یک روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و نمودار ۲ مشخص است بی وزنی تأثیری بر بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 بعد از یک روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$).

جدول ۲: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی BT20 بعد از یک روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-1d(BT20)	REF	1.0	1.000				
timp1-1d(BT20)	TRG	1.0	33,438,342.484	0.224 - Infinity	0.035 - Infinity	0.667	
mmp1-1d(BT20)	TRG	1.0	85,238,389.547	2.500 - Infinity	0.393 - Infinity	0.336	
mmp23-1d(BT20)	TRG	1.0	4,327,192.886	0.046 - Infinity	0.007 - Infinity	0.667	

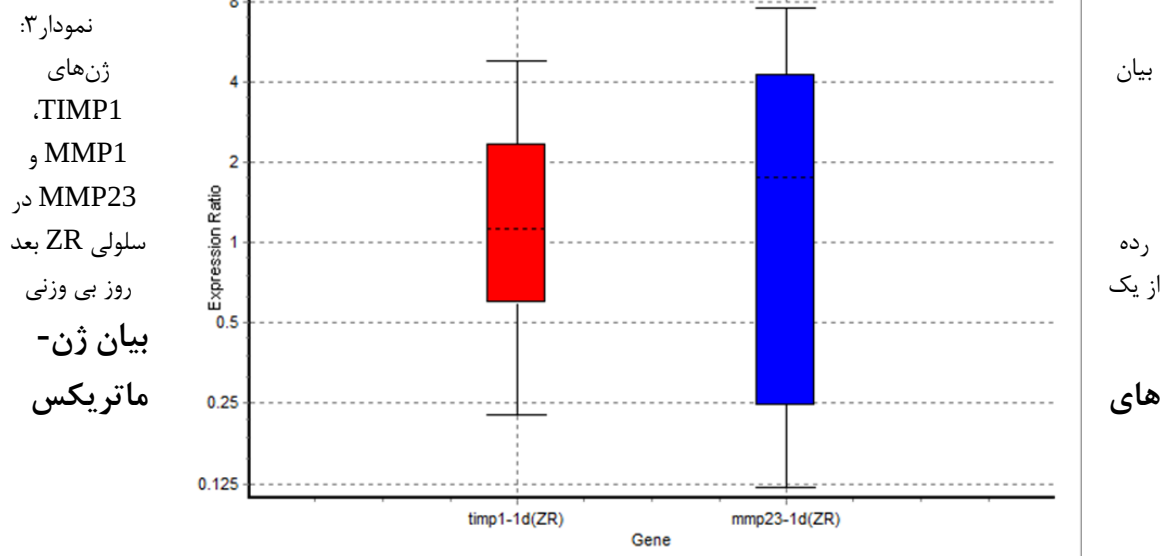


متالوپروتئیناز در رده سلولی ZR بعد از یک روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و نمودار ۳ مشخص است بی وزنی تاثیری بر بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 بعد از یک روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$).

جدول ۳: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی ZR بعد از یک روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-1d(mcf7)	REF	1.0	1.000				
timp1-1d(mcf7)	TRG	1.0	3.972	2.676 - 6.016	2.370 - 6.695	0.000	UP
mmp1-1d(mcf7)	TRG	1.0	0.434	0.280 - 0.843	0.176 - 1.142	0.344	
mmp23-1d(mcf7)	TRG	1.0	0.080	0.047 - 0.138	0.043 - 0.151	0.000	DOWN

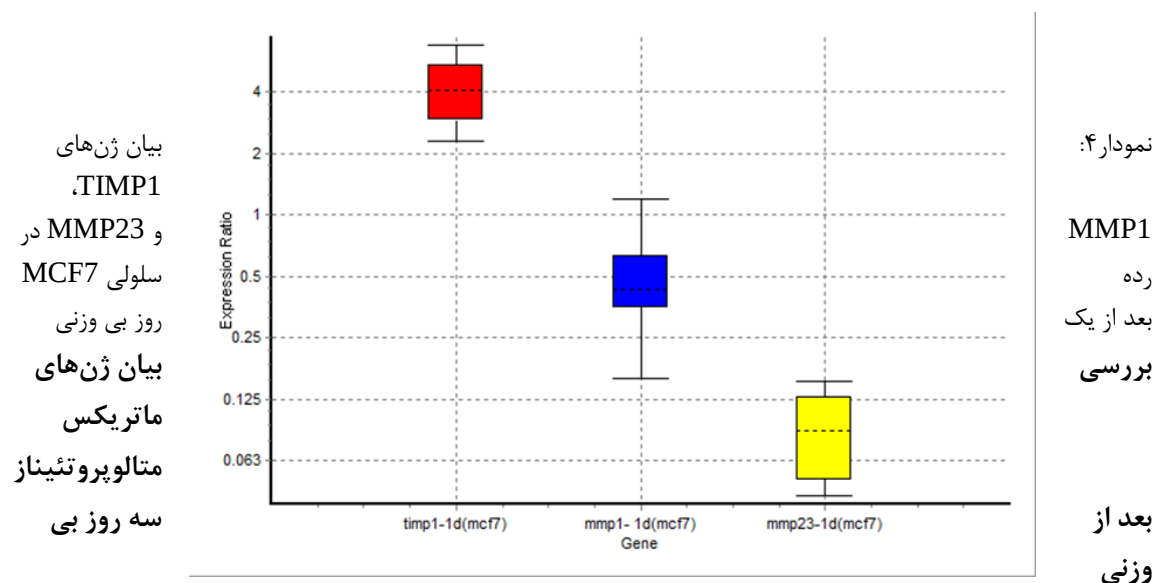


متالوپروتئیناز در رده سلولی MCF7 بعد از یک روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و نمودار ۴ مشخص است بی وزنی کاهش معنی داری بر بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 بعد از یک روز بی وزنی داشت ($P \leq 0/05$) و تأثیری بر بیان ژن MMP1 بعد از یک روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$)

جدول ۴: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی MCF7 بعد از یک روز بی وزنی

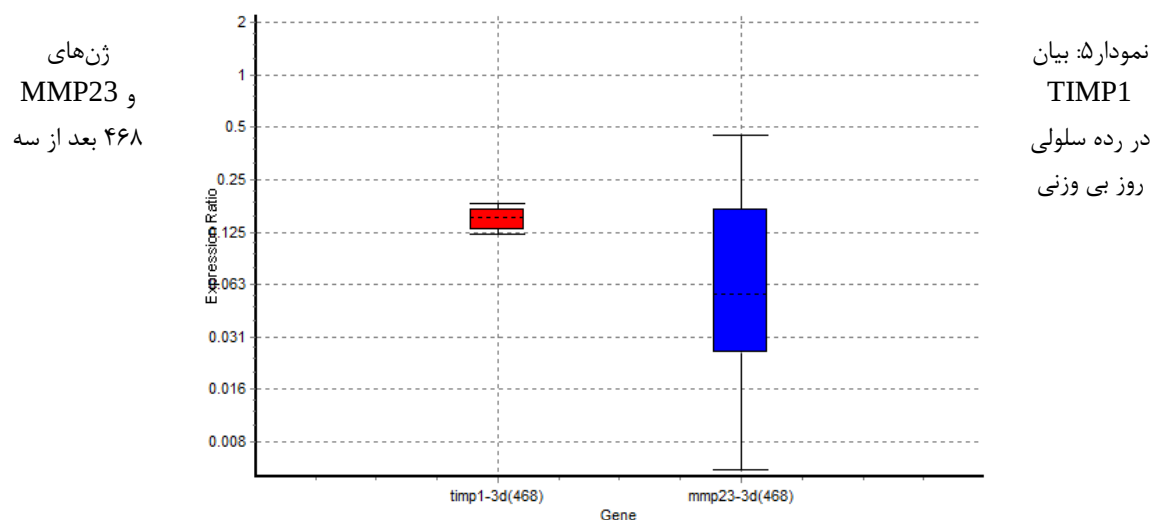
Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-1d(mcf7)	REF	1.0	1.000				
timp1-1d(mcf7)	TRG	1.0	3.972	2.676	2.370	0.000	UP
				- 6.016	- 6.695		
mmp1-1d(mcf7)	TRG	1.0	0.434	0.280	0.176	0.344	
				- 0.843	- 1.142		
mmp23-1d(mcf7)	TRG	1.0	0.080	0.047	0.043	0.000	DOWN
				- 0.138	- 0.151		



بیان ژنهای ماتریکس متالوپروتئیناز در رده سلولی ۴۶۸ بعد از سه روز بی وزنی همان گونه که در جدول و نمودار ۵ مشخص است بی وزنی تاثیری بر بیان ژن TIMP1 بعد از سه روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$) ولی بی وزنی منجر به کاهش معنی دار ($P \leq 0/05$) در بیان ژن MMP23 در رده سلولی ۴۶۸ بعد از سه روز بی وزنی شده است.

جدول ۵: بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 در رده سلولی ۴۶۸ بعد از سه روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-3d(468)	REF	1.0	1.000				
timp1-3d(468)	TRG	1.0	0.150	0.127 - 0.177	0.123 - 0.182	0.169	
mmp23-3d(468)	TRG	1.0	0.050	0.018 - 0.275	0.007 - 0.426	0.000	DOWN

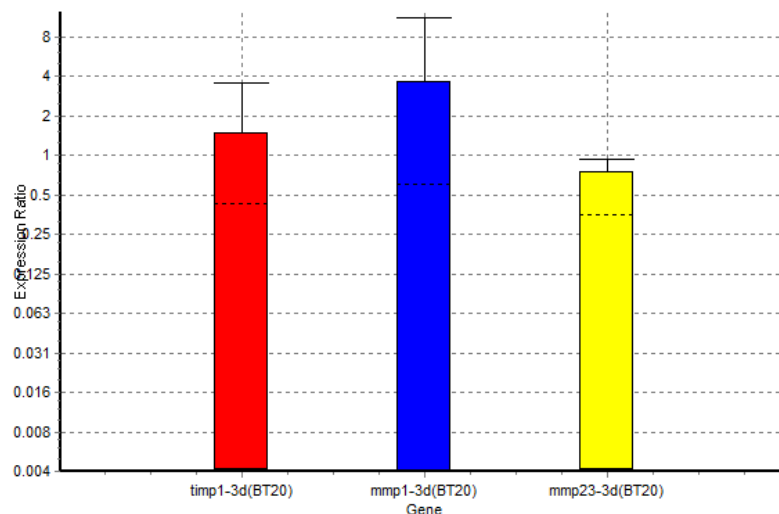


بیان ژنهای ماتریکس متالوپروتئیناز در رده سلولی BT20 بعد از ۳ روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و نمودار ۶ مشخص است بی وزنی تاثیری بر بیان ژن TIMP1 بعد از سه روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$). ولی بی وزنی منجر به کاهش معنی دار ($P \leq 0/05$) در بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی BT20 بعد از سه روز بی وزنی شده است.

جدول ۶: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی BT20 بعد از سه روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-3d(BT20)	REF	1.0	NaN				
timp1-3d(BT20)	TRG	1.0	0.000	0.000 - 2.251	0.000 - 3.330	0.000	DOWN
mmp1-3d(BT20)	TRG	1.0	0.000	0.000 - 6.403	0.000 - 10.410	0.000	DOWN
mmp23-3d(BT20)	TRG	1.0	0.000	0.000 - 0.820	0.000 - 0.910	0.000	DOWN



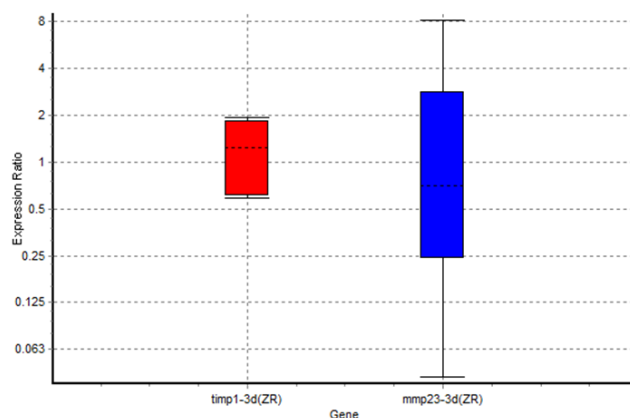
نمودار ۶: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی BT20 بعد از سه روز بی وزنی

بیان ژنهای ماتریکس متالوپروتئیناز در رده سلولی ZR بعد از سه روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و شکل ۷ مشخص است بی وزنی تاثیری بر بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 بعد از سه روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$).

جدول ۷: بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 در رده سلولی ZR بعد از سه روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-3d(ZR)	REF	1.0	1.000				
timp1-3d(ZR)	TRG	1.0	1.061	0.600 - 1.875	0.589 - 1.912	0.830	
mmp23-3d(ZR)	TRG	1.0	0.580	0.168 - 4.768	0.061 - 7.586	0.661	



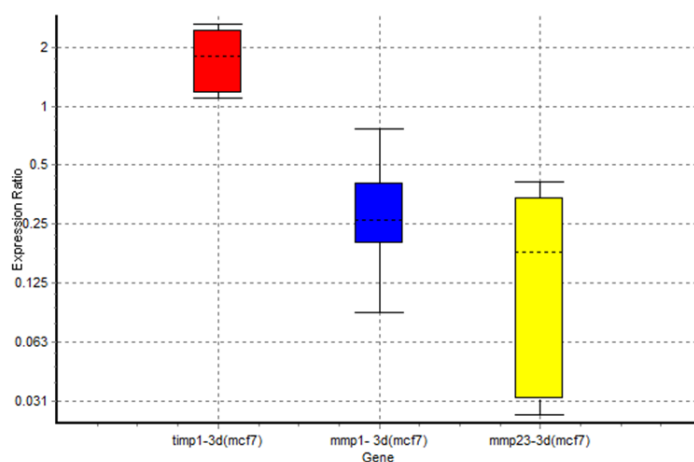
نمودار ۷: بیان ژنهای TIMP1 و MMP23 در رده سلولی ZR بعد از سه روز بی وزنی

بیان ژنهای ماتریکس متالوپروتئیناز در رده سلولی MCF7 بعد از سه روز بی وزنی

همان گونه که در جدول و شکل ۸ مشخص است بی وزنی کاهش معنی داری بر بیان ژن MMP1 و MMP23 بعد از سه روز بی وزنی داشت ($P \leq 0/05$) و تاثیری بر بیان ژن TIMP 1 بعد از سه روز بی وزنی نداشت ($p \geq 0/05$).

جدول ۸: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی MCF7 بعد از سه روز بی وزنی

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
gapdh-3d(mcf7)	REF	1.0	1.000				
timp1-3d(mcf7)	TRG	1.0	1.699	1.140 - 2.539	1.101 - 2.623	0.321	
mmp1-3d(mcf7)	TRG	1.0	0.262	0.159 - 0.541	0.100 - 0.733	0.000	DOWN
mmp23-3d(mcf7)	TRG	1.0	0.104	0.030 - 0.371	0.027 - 0.405	0.000	DOWN



نمودار ۸: بیان ژنهای TIMP1، MMP1 و MMP23 در رده سلولی MCF7 بعد از سه روز بی وزنی

بحث و بررسی

سرطان سینه بیشترین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان آمریکاست. این تومورها به ندرت در مراحل اولیه تشخیص داده می شوند. بیشتر سرطان‌های پستان در هنگام تشخیص در سر تا سر پستان گسترش یافته اند. بیشتر سرطان‌های پستان خود به خودی اند، اما تعادل قابل توجهی از نشانگان‌های شناخته شده ی خانوادگی سرطان همراه هستند. عامل خطر اصلی درابتلا به این سرطان در نتیجه تجمع آسیب های ژنتیکی در سلول‌های اپیتelial بافت سازنده شیر و کسب فنوتیپ‌های بدخیم (تکثیر خارج از کنترل، جلوگیری از مرگ سلولی و متاستاز) توسط این سلول‌ها بروز می‌کنند (۱۱). سرطان‌های پستان گروه ناهمگنی از تومورهای به لحاظ بافت شناسی متمایز هستند. شایع‌ترین سرطان‌های پستان، کارسینوماهای مجرای درجا هستند که در سلول‌های سطح پستان ایجاد می‌شوند. زیر گروه‌های بافتی آن عبارتند از: اشکال سرمی، سلول شفاف، اندومتروئید و موسینی مطالعات زیست شناسی فضایی برای چندین دهه است که شروع شده است. این مطالعات از ۳ جهت برای محققان ارزشمند است: در درجه اول برای فرستادن انسان به فضا و انجام ماموریت‌های فضایی طولانی مدت، باید تاثیر و میزان تغییرات سیستم‌های زیستی در فضا و مشکلاتی را که فضانوردان پس از بازگشت به زمین با آن مواجهه هستند، مشخص شود. مطالعات زیست شناسی فضایی از سوی دیگر موجب افزایش دانش و فهم ما از نحوه عملکرد ارگان‌های و واکنش‌های اساسی زیست شناسی می‌گردد. در طول تکامل حیات بر روی زمین در شرایط جاذبه ۱g گسترش یافته است. تاثیر این نیرو و جبر بر حیات، تا به امروز به خوبی مطالعه نشده است. از آنجا که جاذبه به عنوان یک متغیر بر روی فرایندهای زیستی تاثیرگذار است حذف آن می‌تواند برخی از سوالاتی را که در این حوزه وجود دارد روشن سازد (۱۲). نتایجی که از مطالعات زیست‌شناسی در جاذبه ناچیز به دست می‌آید می‌تواند در بهبود کیفیت زندگی انسان بر روی زمین و سلامت آن موثر باشد. به عنوان مثال نتیجه

مطالعات کاهش توده استخوانی در فضانوردان می‌تواند در توسعه روش‌های درمانی برای بیماری پوکی استخوان بر روی زمین استفاده شود. جاذبه نیرویی مکانیکی است و تغییر در آن، در واقع تغییر در نیروی وارده از محیط به سلول است و یک تغییر محیطی چشمگیر به حساب می‌آید. بنابراین جای تعجب نیست که یک سلول به تغییرات جاذبه از ۱g به صفر واکنش داده و خود را با آن سازگار می‌کند. سلول‌ها، محیط فیزیکی اطراف خود را از طریق انتقال نیروهای مکانیکی وارد بر خود (هدایت مکانیکی) حس می‌کنند. سلول‌ها این کار را از طریق ترجمه نیروهای مکانیکی وارد بر خود و تبدیل آن به سیگنال‌های بیوشیمیایی مانند تغییر غلظت یون کلسیم درون سلولی یا فعال کردن مسیرهای سیگنالی معکوس، انجام می‌دهند. این سیگنال‌ها و بازخوردهای سلول به نیروهای مکانیکی می‌تواند موجب سازگار کردن و تعدیل ساختارهای درون سلولی و خارج سلولی و تعدیل اعمال سلولی چون مهاجرت، تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) گردد که برای تکوین ارگان‌های مختلف و هموستازی بدن لازم و ضروری است. در نتیجه، نقص در انتقال این نیروهای مکانیکی موجب بروز بیماری‌های مختلفی می‌شود (۱۳). کشت بافت در فضا و شرایط بی وزنی در مقایسه با زمین، منجر به ایجاد میزان بیشتر بافت و بافت‌های بزرگ‌تر می‌گردد که این امر در زیست فناوری (بیوتکنولوژی) برای تولید مواد زیستی و داروهای مختلف چون مولکول‌های سیستم ایمنی بدن، هورمون‌ها، آنزیم‌ها و واکسن‌ها در مقیاس صنعتی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بر روی زمین و در شرایط جاذبه سلول‌ها در ظروف کشت در سطح دوبعدی رشد کرده و کف ظرف را پر می‌کنند. در شرایط بی وزنی به دلیل عدم ته نشینی سلول‌ها، آن‌ها به صورت سه بعدی رشد کرده و تشکیل بافت سه بعدی می‌دهند. این امر در پزشکی و برای مهندسی بافت و تشکیل بافت جهت پیوند اعضا برای درمان بسیاری از بیماری‌ها سودمند است (۱۴). امروزه بخش عظیمی از تحقیقات ناسا به مهندسی بافت در شرایط بی وزنی اختصاص یافته است. یکی از شرایط جدید برای تمایز استفاده

^۱- Mechanotransduction

مطالعه از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی برای مقایسه بیان ژنهای موردنظر در سلولهای کنترل (کشت شده در شرایط ۱g) و سلولهای کشت شده در شرایط بی وزنی پس از ۱، ۲ و ۳ روز استفاده شد. نتایج ما حاکی از این بود که بی وزنی موجب تغییر بیان ژن ها می شود. بیان ژن های MMP1، MMP8، TIMP1 در روز اول بی وزنی تفاوتی با گروه کنترل نداشت و بیان ژن های MMP23 در مقایسه با گروه کنترل به صورت منفی تنظیم شده است. اما بیان ژن MMP23 در روز بعد بصورت منفی تنظیم شده است بیان ژن MMP23 در گروه بی وزنی در روز سوم با روز اول تفاوتی نداشت و اختلاف معنی داری را با نمونه های کنترل نشان می داد. MMP8 و MMP27 بیان نشده است.

بیان ژن TIMP1 در گروه بی وزنی در روز سوم مقایسه با روز اول تفاوتی نداشت و اختلاف معنی داری را با نمونه های کنترل نشان نمی داد. بیان ژن MMP1 در گروه بی وزنی در روز سوم مقایسه با روز اول به صورت منفی تنظیم شده است و اختلاف معنی داری را با نمونه های کنترل نشان می داد.

نتیجه گیری

MMP1، MMP8، به طور کلی در تحقیق حاضر، بیان ژن های در ۴ لاین سلولی سرطان TIMP1 و MMP23 و MMP27 سینه در شرایط بی وزنی شبیه سازی شده و مقایسه بیان Real Time PCR آن ها با شرایط زمینی به روش موردبررسی قرار گرفته شد. مطالعات انجام شده در زمینه به و بررسی بسیار محدود Real Time-PCR کارگیری روش بوده و همان گونه که می دانیم این روش از حساسیت و نتایج اگرچه مطالعات قابل اطمینان بیشتری برخوردار است چندی بر بیان این ژن ها در شرایط زمینی انجام گرفته است ولی این مطالعه به عنوان اولین بار در شرایط وزنی شبیه همان طور که در قسمت نتایج سازی شده صورت گرفت ذکر گردید بی وزنی بر بیان ژن های فوق تاثیر گذار است و ۱ زمینی می -g موجب تغییر بیان آن ها نسبت به شرایط ...شود

از محیط بی وزنی است که امروزه برای کشت سلول و مهندسی بافت می توان از آن استفاده کرد. در شرایط بی وزنی تغییراتی مهم چون عدم رسوب و ته نشینی، تغییر در جریان های همرفت و فشار هیدرواستاتیک در کشت سلولی اتفاق می افتد. در جاذبه ۱g، سلول های پستانداران در عرض دقایقی کوتاه در ته فلاسک ته نشین شده و در سطح آن پخش شده یا به آن می چسبند. اما در جاذبه صفر، سلول ها در محیط کشت معلق می مانند. رفتن از جاذبه ۱g به جاذبه صفر مثل تغییر مکان از محیط دوبعدی به محیط سه بعدی است. این امر تأثیر چشمگیری بر میان کنش های سلولی، حرکت سلول و شکل آن دارد. با توجه به تفاوت های ذکر شده در شرایط بی وزنی و جاذبه ۱g می توان از این تفاوت ها جهت کشت سلول و تمایز استفاده کرد (۱۵). مطالعات نشان داده است که در شرایط بی وزنی تمایز به سمت سلول هایی مانند چربی بیشتر است اما در شرایط هایپرگراویتی سلول ها تمایل بیشتری به سمت تمایز به استخوان و غضروف دارند. و مجموع این تفاوت ها بین شرایط بی وزنی و جاذبه را می توان در تغییرات فیزیولوژیکی که در فضا نوردان ایجاد می شود مشاهده کرد. از دست دادن بافت یا اندام ناشی از جراحی یا هر آسیب دیگری یکی از مهم ترین مسائل بالینی است. برای درمان جایگزینی، ترمیم بوسیله جراحی، پروتزهای مصنوعی برای ترمیم اندام یا بافت از دست رفته، پیشنهاد می شود. اما تمامی این روش ها با محدودیت هایی همراه است، تکثیر بیوشیمیایی سلول ها عمومی ترین تکنیکی است که استفاده می شود. اگر چه اخیراً نیروهای بیوفیزیکی، مانند استرس لرزش و بی وزنی برای تکثیر سلول ها بسیار استفاده شده است. در میان نیروهای بیوفیزیکی، بی وزنی به خصوص در زمینه مهندسی بافت بسیار مورد توجه است. نشان داده شده که بی وزنی محیط ایده آل برای رشد سلول، تکثیر سلول و تشکیل اندام است. قرار گرفتن در شرایط بی وزنی باعث برداشته شدن فشار از روی بافت های استخوانی و نیز سایر بافت هایی که تحت فشار هستند، می شود این مسئله باعث تضعیف شدن این بافت ها می شود (۱۶). هدف از این مطالعه بررسی اثر بی وزنی شبیه سازی شده بر بیان ژن های MMP8، MMP1، MMP27 و MMP23 و TIMP1 می باشد. ژن های موردنظر در این مطالعه MMP23، MMP1 و TIMP1 بود. در این

مراجع

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, L. Siegel R, A. Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: Cancer J Clin. 2018; 6(68): 394-424.
2. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. Biological Res. 2017; 33(50).
3. Scully O.J, Bay B.H, Yip G, Yu Y. Breast cancer metastasis. Cancer Genomics & Proteomics. 2012; 5(9): 311-320.
4. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nature Rev Cancer. 2006; 12(6): 924-935.
5. Canel M, Serrels A, Frame M.C, Brunton VGE-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. J Cell Sci. 2013; 2(126): 393-401.
6. Moo T.A, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of breast cancer therapy. PET Clinics. 2018; 3(13): 339-354.
7. Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Bauer J, Kossmehl-Zorn S, Cogoli A, Curcio F, Oksche A, Wehland M, Kreutz R, Paul M, Grimm D. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. Cell Tissue Res. 2006; 2(324): 267-277.
8. Vassy J, Portet S, Beil M, Millot G, Fauvel-Lafève F, Karniguian A, Gasset G, Irinopoulou T, Calvo F, Rigaut JP, Schoevaert D. Weightlessness acts on human breast cancer cell line MCF-7. Adv Space Res. 2003; 32(8): 1595–1603.
9. Chang D, Xu H, Guo Y, Jiang X, Liu Y, Li K, Pan C, Yuan M, Wang J, Li T, Liu C. Simulated microgravity alters the metastatic potential of a human lung adenocarcinoma cell line. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2013; 49(3): 170–177.
10. Tan X, Xu A, Zhao T, Zhao Q, Zhang J, Fan C, Deng Y, Freywald A, Genth H, Xiang J. Simulated microgravity inhibits cell focal adhesions leading to reduced melanoma cell proliferation and metastasis via FAK/RhoA-regulated mTORC1 and AMPK pathways. Sci Rep. 2018; 8: 3769.
11. Ye J, Zhu X, Li Y, Sun L, Wang X, Hu Y. Molecular characterization of breast cancer cell line MCF-7. Pract J Cancer. 2012; 27(2): 116–119.
12. Foroni C, Broggini M, Generali D, Damia G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. Cancer Treat Rev. 2012; 38(6): 689–697.
13. Zhang X, Zhang Y, Li Y. β -elemene decreases cell invasion by upregulating E-cadherin expression in MCF-7 human breast cancer cells. Oncol Rep. 2013; 30(2): 745–750.
14. Zare Z, Farzaneh P, Pourbagher R, Heidari M, Ghasemi A, Mohammadi M. The effect of piperine on MMP-9, VEGF, and E-cadherin expression in breast cancer MCF-7 cell line. Basic Clin Cancer Res. 2020; 12(3): 112–119.
15. Sahana J, Cortés-Sánchez JL, Sandt V, Melnik D, Corydon TJ, Schulz H, Cai Z, Evert K, Grimm D, Wehland M. Long-term simulation of microgravity induces changes in gene expression in breast cancer cells. Int J Mol Sci. 2023; 24(2): 1181.
16. Baghoum H, Alahmed H, Hachim M, Senok A, Jalaleddine N, Al Heialy S. Simulated microgravity influences

immunity-related biomarkers in lung cancer. Int J Mol Sci. 2022;24(1):155.

Study of the effect of weightlessness on the expression of MMP1, MMP8, MMP23, MMP27, and TIMP1 genes in breast cancer cell lines

Elnaz Rezaei Dolat Abad

Corresponding Author: re.elnaz1361@gmail .com

Abstract

Gravity is one of the most important forces acting on living organisms on Earth, which affects cells, molecules, and consequently the entire organism during life. The aim of this study was to investigate the effect of simulated weightlessness on changes in the expression of MMP1, MMP23, MMP 8, MMP 27, and TIMP1 genes in breast cancer cell lines called MCF-7, MDA-MB468, BT20, and ZR75. In order to apply weightlessness, cancer cells were placed on a clinostat device for one and three days. To examine the viability of cells and the metabolic activity of the cells, the MTT test was used, and apoptosis and a series of changes in the cell surface and plasma membrane were examined using the Annexin kit. Then, RNA was extracted from the cells and weightlessness changes were measured by Real Time PCR. The findings showed that weightlessness for one day reduced the expression levels of TIMP1, MMP23, and MMP1 genes, but with continued weightlessness for three days, the expression returned to control levels. By optimizing the duration of weightlessness treatment, it is possible to witness significant changes in gene expression, which could lead to steps in discovering the mechanisms involved in cancer and its treatment.

Keywords: Weightlessness, Breast Cancer Cell, MMP, Clinostat, Real Time PCR.