دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه‌کارشناسی‌ارشد علوم تشریح

عنوان:

بررسی اثر جایگزینی microRNA تنظیم کننده مهاجرت و آپوپتوز و تغییر بیان ژن PD-L1 در رده‌ی سلولی سرطان معده (AGS-MKN45)

نگارش:

نگین امانی

اساتید راهنما:

دکترمحمد قاسم گل محمدی

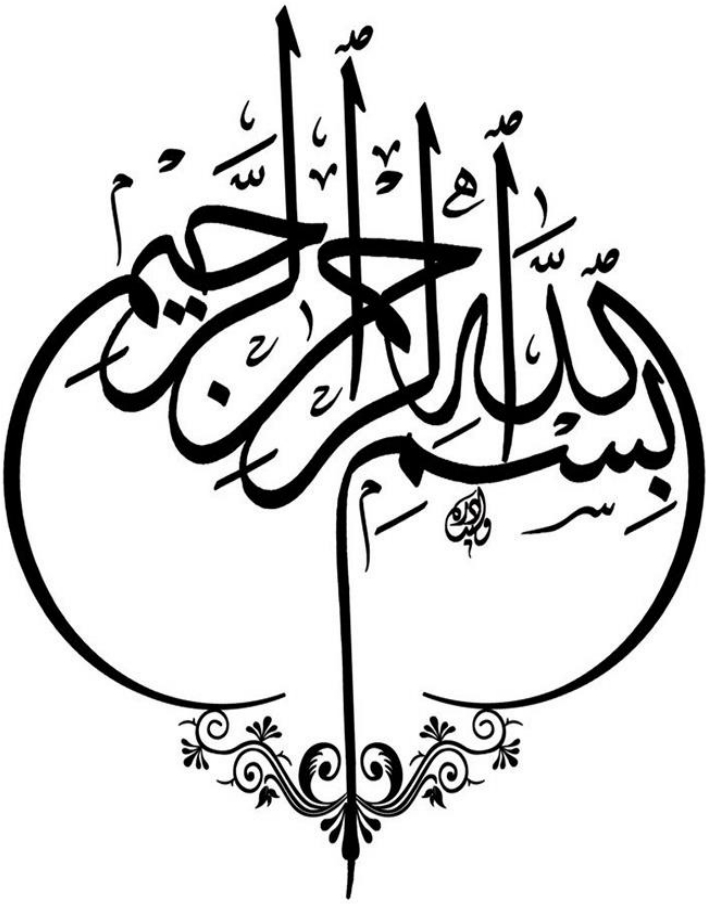
دکتر الهام صفرزاده

استاد مشاور:

دکتر محسن سقا

آبان ماه ۱۴۰۱

شماره پایان‌نامه:۰۹۲


بسم الله الرحمن الرحيم

گواهی اصالت پایان نامه

بسمه تعالی

بدین وسیله اعلام می نمایم که این پایان‌نامه براساس نتایج بررسی‌ها و تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب بوده و به وسیله خودم انشاء گردیده است و قبلاً به عنوان پایان‌نامه در سایر مقاطع و دوره‌های تحصیلی ارائه نگردیده است.

مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است کلیه حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه و محصول مستخرج از آن اعم از نامه، کتاب، مقالات و... به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تعلق دارد.

نام و نام خانوادگی دانشجو:

نگین امانی

امضاء و تاریخ:

بدینوسیه اصالت و صحت نتایج این پایان‌نامه مورد تأیید اینجانب استاد راهنما می‌باشد.

نام و نام خانوادگی استادان راهنما:

دکتر الهام صفرزاده و دکتر قاسم گل‌محمدی

امضاء و تاریخ:

تقدیم به:

تقدیم به مقدس‌ترین واژه‌ها در لغت‌نامه دلم،

" پدر و مادر "عزیزم

که زندگی‌ام را مدیون مهر عطوفت آنان می‌دانم

و تقدیم به "دلبندم "

که کودکی گم شده‌ام را در چهره معصومش پیدا کردم.

تقدیر و تشکر

سپاس خدای بزرگ را که مرا یاری رساند تا بتوانم این مقطع تحصیلی را به پایان رسانده و گامی در راستای اعتلای علم بردارم.

از اساتید راهنمای گرانقدرم سرکار خانم دکتر الهام صفرزاده و جناب آقای دکتر قاسم گلمحمدی که وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم بوده است و بدون شک انجام این پایان‌نامه بدون کمک و راهنمایی‌های ارزنده آن‌ها امکان‌پذیر نبوده است کمال تشکر را دارم و از استاد گرامی جناب آقای دکتر محسن سقا که استاد مشاور این پایان‌نامه بودند بخاطر راهنمایی‌های بسیار ارزنده ی ایشان بی نهایت سپاس گذارم.

فهرست مطالب

چکیده: ۱

فصل اول: مقدمه ۳

۱-۱- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۴

۱-۲- واژه‌های اختصاصی ۷

۱-۲-۱- سرطان معده ۷

۱-۳- microRNA ۷

۱-۴- PD-L1 ..... ۷

۱-۵- Apoptosis ۸

۱-۶- Metastasis ۸

۱-۷- AGS ۸

۱-۸- MKN-45 ..... ۸

۱-۹- KATOIII ۸

۱-۱۰- اهداف و فرضیات طرح ۹

۱-۱۰-۱- هدف کلی ۹

۱-۱۰-۲- اهداف اختصاصی ۹

۱-۱۰-۳- هدف کاربردی ۹

۱-۱۱- سؤالات و فرضیه‌های تحقیق ۱۰

فصل دوم: بررسی متون ۱۱

۲-۱- مبانی نظری ۱۲
۲-۱-۱ سرطان ۱۲
۲-۲- بیولوژی سرطان ۱۲
۲-۳- سرطان معده ۱۳
۲-۳-۱- اپیدمیولوژی سرطان معده ۱۳
۲-۳-۲- فاکتورهای خطر سرطان معده ۱۴
۲-۳-۳-۱-نوع روده ای ۱۵
۲-۳-۳-۲-نوع منتشر ۱۵
۲-۳-۳- طبقه بندی سرطان معده ۱۵
۲-۴- خصوصیات ژنومی سرطان معده‌ی پیشرفته ۱۵
۲-۵- راهبردهای پیشگیری از سرطان معده ۱۷
۲-۵-۱- رژیم غذایی ۱۷
۲-۵-۲- ریشه کنی هلیکوباکترپیلوری ۱۷
۲-۵-۳- روش‌های درمانی ۱۷
۲-۵-۴- microRNA ۱۸
۲-۶- تاریخچه microRNA ۱۹
۲-۷- سنتز microRNA ۱۹
۲-۸- نقش microRNA ها درتوسعه ی سرطان ۲۱
۲-۹- روش‌های درمانی با microRNA ها ۲۴
۲-۱۰- مسیر اصلی برای هدف‌گیری microRNA و تحویل به سلول‌های هدف ۲۴

۲-۱۱- microRNA و سرطان معده ۲۶
۲-۱۲- MicoRNA-320a ۲۶
۲-۱۳- microRNA-320a در سرطان معده ۲۷
۲-۱۴- مهاجرت سلولی و متاستاز ۲۷
۲-۱۵- پروتئین PD-L1 ..... ۲۸
۲-۱۵-۱- E-Cadehrin ۲۸
۲-۱۵-۲- Vimentin ۲۹
۲-۱۵-۳- P53 ..... ۲۹
۲-۱۵-۴- Caspase3 ..... ۳۰
۲-۱۵-۵- CDK16 ..... ۳۰
۲-۶- پیشینه تحقیق: ۳۰
فصل سوم: مواد و روش کار ۳۶
۳-۱- ملاحظات اخلاقی ۳۷
۳-۲- نوع مطالعه ۳۷
۳-۳- زمان انجام مطالعه ۳۷
۳-۴- محیط پژوهش ۳۷
۳-۵- نمونه‌های مورد مطالعه ۳۷
۳-۷- مراحل کار ۴۰
۳-۷-۱- آماده‌سازی محیط کشت RPMI-1640 ..... ۴۰
۳-۷-۲- دفریز کردن سلول‌های منجمد ۴۰

۳-۷-۳- شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده: ۴۲
۳-۷-۴- موادلازم برای شمارش سلولی: ۴۲
۳-۷-۵- مراحل کار شمارش سلولی: ۴۳
۳-۷-۶- کشت سلولی: ۴۴
۳-۷-۷- مراحل پاساژ سلولی: ۴۴
۳-۷-۸- مراحل فریز کردن سلول‌ها: ۴۵
۳-۷-۹- ترنسفکت: ۴۶
۳-۷-۱۰- مراحل استخراج RNA: ۴۸
۳-۷-۱۱- سنتز cDNA : ۵۰
۳-۷-۱۲- سنتز cDNA ژن: ۵۰
۳-۷-۱۳- محتویات کیت ۵۱
۳-۷-۱۴- مرحله اول: ۵۲
۳-۷-۱۵- مرحله دوم: ۵۲
۳-۷-۱۶- مرحله سوم: ۵۳
۳-۷-۱۷- qRT-PCR ۵۳
۳-۸- دستگاه مخصوص PCR و سیستم کامپیوتری متصل به دستگاه ۵۳
۳-۹- اصول PCR کمی با استفاده از SYBR Green ۵۴
۳-۹-۱- حساسیت ۵۴
۳-۹-۲- ویژگی ۵۵
۳-۹-۳- آنالیز منحنی Melting ۵۵
۳-۹-۴- MicroRNA Gene qRT-PCR ۵۶

۳-۹-۵- Gene qRT-PCR ۵۸
۳-۹-۶- استاندارد داخلی ۵۸
۳-۱۰- بررسی خاصیت سایتوتو کسیک miR-320a با روش MTT: ۵۹
۳-۱۱- سنجش مهاجرت سلولی توسط Wound healing assay ۶۰
۳-۱۲- فلوسایتومتری ۶۱
۳-۱۳- آنالیز آماری ۶۲
فصل چهارم: نتایج ۶۳
۴-۱- یافته‌ها ۶۴
۴-۱-۱- نتیجه ی کشت سلولی: ۶۴
۴-۲- تصویر سلول‌ها ۶۴
۴-۳- نتایج ارزیابی ترنسفکت: ۶۶
۴-۴- اثر جایگزینی miR-320a بر میزان بیان ژن‌های PD-L1 ، E-Cadehrin ، Vimentin ، P53 ، Caspase3 ، CDK16 در سلول‌های (AGS-MKN45-KATOIII) ۶۸
۴-۵- اثر سایتوتوکسیک جایگزینی miR-320a در سلول‌های (AGS-MKN45-KATOIII) ۷۵
۴-۶- نتایج تست Wound healing assay: ۷۷
فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۸۲
۵-۱- بحث ۸۳
۵-۲- نتیجه‌گیری کلی: ۹۰
۵-۳- پیشنهادت: ۹۱
منابع ۹۲

فهرست جداول

جدول ۱-۲: بیومارکرهای مولکولی در توسعه‌ی سرطان معده ۱۶

جدول ۲-۲: microRNA ها و هدف‌های آن‌ها در سرطان‌های مختلف ۲۳

جدول ۱-۳:وسایل مورد نیاز ۳۹

جدول ۲-۳: آماده‌سازی بافر مخصوص الکتروپورشین EBP ۴۷

جدول ۳-۳: مقادیر و مواد لازم برای سنتزcDNA ۵۲

جدول ۴-۳: مقادیر و مواد لازم برای انجامReal-Time PCR ۵۷

جدول ۵-۳: سیکل دمایی به کار برده شده برای انجامReal-Time PCR ۵۸

فهرست اشکال

شکل ۱-۲: فاکتورهای خطردر سرطان معده ۱۴

شکل ۳-۲:microRNA ها به عنوان انکوژن یا بازدارنده تومور. ۲۲

شکل۴-۲:نقش microRNA ها در سرطان های انسانی. ۲۳

شکل ۵-۲: عملکردmicroRNA-320درEMT ۲۷

شکل ۱-۴: تصویر سلول سرطانی کشت داده شده رده‌ی سلولی ۶۴

شکل ۲-۴:تصویر سلول سرطانی کشت داده شده رده‌ی سلولی MKN-۴۵ .....۶۵

شکل ۳-۴: تصویر سلول سرطانی کشت داده شده رده‌ی سلولی ۶۵

KATOIII ۶۵

نمودار ۱-۴- نمودار تفاوت بیان miR-320a درسلول‌های ترنسفکت شده در مقایسه با گروه های کنترل (AGS-MKN45-KATOIII) ۶۷

نمودار۲-۴- نمودار تفاوت بیان PD-L1 درسلول‌های ترنسفکت شده در مقایسه با گروه های کنترل (AGS-MKN45-KATOIII) ۶۹

نمودار ۳-۴- نمودار تفاوت بیان Vimentin درسلول‌های ترنسفکت شده در مقایسه با گروه های کنترل (AGS-MKN45-KATOIII) ۷۰

نمودار ۸-۴- اثر جایگزینی miR-320a بر میزان رشد و تکثیر سلولی رده‌ی سلولی (AGS) ۷۵

نمودار۹-۴-اثر جایگزینی miR-320a برا میزان رشد و تکثیر سلولی در رده‌ی سلولی (MKN-45) ۷۶

نمودار۱۰-۴- اثر جایگزینی miR-320a برا میزان رشد و تکثیر سلولی در رده‌ی سلولی (KATOIII) ۷۶

جدول ۱-۴- نتایج تست MTT جهت تعیین IC50 دوز مناسب microRNA ۷۷

شکل ۴-۴- اثر جایگزینی miR-320a بر روی مهار مهاجرت سلولی رده‌ی سلولی (AGS) ۷۸

فهرست اختصارات:

AGO	Argonaute
AMO	Anti-miRNA Oligonucleotide
ATCC	American Type Culture collection
CDH1	Cadherin-1
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte Associated Protein 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EXP-5	Exportin-5
EPB	Electroporation Buffer
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
FBS	Fetal Bovine Serum
GC	Gastric Cancer
H-pylori	Helicobacter Pylo**ri**
MTT	3(4,5-Dimethylthiazol-2y1)2,5 Diphenyltetrazolium Bromide
miRNA	microRNA
MMP-13	Matrix Metalloproteinase 13
MiR-320a	microRNA-320a
ncRNA	Non-Coding RNA
Oncomir	Oncgenic microRNA
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Program Cell Death-1
PD-L1	Program Cell Death- Ligand-1
Pri-microRNA	Primary micro RNA
Pre- microRNA	Precursor micro RNA
qRT – PCR	Quantitative Real Time Pcr
RISC	RNA Induced Silencing Coplex
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute1640
TCGA	The Cancer Genome Atlas

TSG	Tumor Suppressor Genes
3' UTR	3'- Untranslated Regio

بررسی اثر جایگزینی microRNA تنظیم کننده مهاجرت و آپوپتوز و تغییر بیان ژن PD-L1 در رده‌ی سلولی سرطان معده (AGS-MKN45)

چکیده:

زمینه :در بین سرطان‌ها سرطان معده یکی از علل عمده‌ی مرگ ناشی از سرطان می‌باشد که حدود ۵۰ درصد از کل سرطان‌های گوارشی را در برمی‌گیرد. تغییرات بیان ژن‌ها در انواع سرطان‌ها از جمله سرطان معده ، سینه ، کلون ، پروستات و ... مشاهده شده است. بسیاری از ژن‌های مؤثر در تکوین سرطان توسط microRNA ها تنظیم می‌شوند. miRNA هادر میان انواع چک پوینت‌های ایمنی CTLA-4 و PD-1/PD-L1 و ... از نظر مهار کنندگی بهترین اثر درمانی را دارند. مطالعات نشان می دهد بیان microRNA-۳۲۰a در سرطان معده کاهش می‌یابد.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تغییر بیان microRNA -۳۲۰a پس از جایگزینی در رده‌ی سلولی سرطان معده (AGS-MKN45) وتاثیر آن بر مهار رشد و مهاجرت این سلول‌ها و کاهش بیان ژن PDL-1 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: طی این مطالعه سلول‌های سرطانی معده رده ی (AGS-MKN45) در محیط کشت RPMI1640 کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و رطوبت ۹۵٪ و۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. با استفاده ازروش الکتروپوریشن microRNA-320a به داخل سلول‌های سرطانی ترنسفکت شدو برای بررسی افزایش بیان ژن microRNA-۳۲۰a و همچنین تأثیر بر تغییر بیان ژن‌های مورد هدف در سلول‌های سرطانی از تست RT-PCR استفاده شدو به دنبال نتایج حاصل از تست RT-PCR برای بررسی مهار تکثیر سلول‌های سرطانی از تست MTT استفاده شدو سپس برای بررسی میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های سرطانی از تست Flow Cytometry استفاده کردیم و در نهایت برای بررسی مهاجرت سلول‌های سرطانی ازتست Wound healing assay استفاده شد.

نتایج: نتایج آزمون‌های انجام شده نشان دهنده ی افزایش معنی دار ژن microRNA-۳۲۰a و کاهش ژن PD-L1در هر سه رده ی سلولی به دنبال ترنسفکت microRNA-۳۲۰a در مقایسه با گروه کنترل بود. نتایج

حاصل از تست MTT مهار رشد وتکثیر را در سلول‌های سرطانی را نشان دادو نتایج تست Flow Cytometry افزایش آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی نشان داد و در نهایت نتایج تست Wound healing assay کاهش مهاجرت سلولی را در سلول‌های سرطانی را نشان داد .

نتیجه‌گیری:با توجه به اینکه نتایج آزمون‌ها نشان دادند افزایش microRNA-۳۲۰a باعث کاهش بیان ژن‌های دخیل در مهاجرت سلولی و به دنبال آن باعث مهار مهاجرت سلولی و افزایش مرگ سلولی سلول‌های سرطانی (AGS-MKN45)می‌شود، لذا میتوان افزایش سطح بیان microRNA-۳۲۰a و کاهش ژن PD-L1 را در بیماران مبتلا به سرطان معده به عنوان یک گزینه ی کاربردی جهت بررسی ها و مطالعات بیشتر مورد توجه قرار داد .

واژه‌های کلیدی: سرطان معده; مهاجرت سلولی ; ترنسفکت ; microRNA-۳۲۰a ; آپوپتوز