مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره 10، مهر1394، صفحه 45-39

بررسی تاثیر هیپوکسی بر تغییرات بیان miR-107 در رده های سلولی سرطان معده MKN45 و AGS

نوشین آیرملو (DVM)[1]، حسین مزدارانی (PhD)*[1]، سیدجواد مولا (PhD)[2]، علیرضا دلاوری (MD)[3]

1-گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
2-گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس
3-مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: 93/12/8، اصلاح:94/2/16، پذیرش:94/5/7

خلاصه

سابقه و هدف: هیپوکسی در تومورهای جامد، علت اصلی مقاومت به درمان در سرطان است. بنابراین شناخت اندیکاتورهای مناسب جهت آگاهی از وضعیت هیپوکسی در تومور برای انجام روش های صحیح درمانی و آگاهی از پیش اگهی تومور بسیار مفید و ضروری است. هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییر بیان miR-107 به عنوان بیومارکر و اندیکاتور هیپوکسی و ارتباط آن با هیپوکسی در سلول های سرطان معده می باشد.

مواد و روشها: در این تحقیق، رده سلولی سرطان معده MKN45 و AGS از انستیتو پاستور تهران تهیه و درشرایط اکسیژن نرمال(95% O_2 و 5% CO_2) و هیپوکسی (95% N_2 و 5% CO_2) کشت داده شدند و در فواصل زمانی 24 و 48 ساعت بررسی بیان miR-107 و HIF-1α انجام گرفت.

یافته‌ها: با القای هیپوکسی در رده های سلولی بیان HIF-1α در رده MKN45 با افزایش مدت زمان تیمار (24و48 ساعت)، به ترتیب 2/3 و 3/8 برابر افزایش پیدا کرد (p=0/002 و p=0/04) و در رده AGS 2/2 و 3/8 برابر افزایش یافت (p=0/005 و p=0/03). همچنین بیان افزایش یافته miR-107 در رده MKN45 در این بازه های زمانی به ترتیب 2/2 و 3/1 برابر افزایش مشاهده شد (p=0/0001 و p=0/01) و در رده AGS به ترتیب 2/4و 4 برابر افزایش داشت (p=0/0001 و p=0/002).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که القای هیپوکسی در رده های سلولی سرطان معده بر میزان تغییرات بیان miR-107 موثر است.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، هیپوکسی، HIF-1 آلفا،miR-107.

مقدمه

سرطان در کشور های توسعه یافته و در حال توسعه به ترتیب اولین و دومین عامل مرگ می‌باشد. سرطان معده در جهان بعنوان چهارمین سرطان شایع و دومین عامل مرگ بر اثر سرطان شناخته می‌شود (1). این سرطان جزء بیماریهای چند عاملی دسته‌بندی می‌شود و دلیل آن هم ایجاد سرطان بر اثر وجود عوامل عفونی، محیطی و ژنتیکی در افراد می‌باشد (2). بر اساس آمار سال 2005 بیشترین موارد این سرطان در کشورهای ژاپن، چین و روسیه مشاهده شد و کمترین موارد آن نیز مربوط به کشورهای توسعه یافته غربی می‌باشد (3). البته شیوع سرطان معده با میزان مرگ و میر ناشی از آن متفاوت است و بیشتر بعلت تشخیص دیر هنگام سرطان معده در فاز پیشرفته بیماری، می‌باشد (4). هیپوکسی از ویژگی‌های محیطی مهم در تومورهای جامد است (5). در این شرایط سلولهای تومورهای در حال رشد به علت کاهش خون رسانی دچار محرومیت از اکسیژن می‌شوند. بر خلاف تصور در این شرایط سلول های هیپوکسیک توموری قابلیت رشد و تکثیرخود را حفظ می‌کنند و نسبت به درمان‌های رایج از جمله شیمی درمانی و پرتودرمانی مقاوم می‌شوند و این سلول‌ها رفتارهای تهاجمی و متاستاتیک ازخود بروز می‌دهند (6). HIF کمپلکس ترجمه‌ای مهم در پاسخ به تغییرات اکسیژن سلولی است که در شرایط هیپوکسی فعال می‌شود و با اتصال به نواحی (HRE=Hypoxia Response Element) حدود 100 ژن بیان آنها را فعال می‌کند (7). HIF ژنهایی را هدف قرار می‌دهد که پروتئین‌های آنها در بیولوژی تومور مانند انتقال اکسیژن، متابولیسم آهن، گلیکولیز، انتقال گلوکز، رگ‌زایی، تکثیر سلولی، تهاجم و متاستاز دخیل هستند. (8). HIF از دو زیر واحد HIF-1α و زیر واحد HIF-1β تشکیل شده است. تنظیم زیر واحد HIF-1α وابسته به اکسیژن است. در شرایط اکسیژن نرمال، HIF-1α ناپایدار است ولی

▣ این مقاله حاصل پایان نامه نوشین آیرملو دانشجوی دکتری ژنتیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر حسین مزدارانی
آدرس: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی. تلفن: 021-82883830
E-mail: mozdarah@modares.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]

در شرایط هیپوکسی هیدروکسیلاسیون پرولین مهار می شود و باعث ثبات HIF-1α می‌شود. HIF-1α پایدار با واحد HIF-1β دایمر می‌شود و از سیتوپلاسم به هسته منتقل می‌شود و به HRE متصل می‌شود (9). این miRNA هایی که به miRNAهای اختصاصی تنظیم شونده توسط هیپوکسی (HRM=Hypoxia-Regulated miRNAs) شناخته می‌شوند، نقش مهمی در زنده‌مانی سلول در شرایط محیطی اکسیژن کم دارند (10). بررسی نواحی پروموتری HRM ها، ناحیه اتصال فاکتور HIF شناخته شده است. حدود 6% از miRNA های انسانی دارای نواحی اتصال HIF هستند که در بین 17 گونه محافظت شده است که بر اهمیت مطلب تاکید می کند. از زمانی که نقش miRNAها به عنوان فاکتور موثر در پیشرفت سرطان معده شناخته شد، پروفایل بیانی miRNA با استفاده از میکروآری، real-time PCR یا Next Generation Sequencing به صورت گسترده انجام گرفته است. تعدادی از مکانیسم‌های عملکردی miRNA ها در پروسه پیشرفت سرطان معده شناسایی شده است.

miRNA ها نه تنها در تومورهای القا شده توسط انکوژن‌ها بلکه در تومورهای ایجاد شده توسط ژن‌های سرکوب‌گر تومور نیز نقش دارند. امروزه نقش miRNAها در تشخیص و درمان سرطان معده به طور گسترده ثابت شده است. miR-107 بر روی کروموزوم 10q23/31 قرار گرفته است و در مسیرهای مختلفی در سلول از جمله ادیپوژنزیس، چرخه سلولی، هیپوکسی، رگ‌زایی و بیماری‌های نورودژنراتیو نقش دارد. مدارک متعددی مبنی بر نقش انکوژنی آن وجود دارد. افزایش بیان miR-107 در برخی از بدخیمی‌ها از جمله معده، سینه، پانکراس و کلورکتال گزارش شده است (14-11). تغییر در بیان miR-107 در سرطان های مختلف گزارش شده است و این تغییرات بیانی miR-107 به طور معنی داری با ایجاد و پیشرفت سرطان مرتبط شناخته شده است. اما نقش آن در سرطان معده هنوز به طور کامل مشخص نشده است. کاهش بیان miR-107 در برخی سرطان ها گزارش شده است. بسیاری از تحقیقات دیگر نیز افزایش بیان miR-107 را در سرطان های معده (15و13)، مری (16) و کبد (17) مطرح کرده اند که بر نقش مثبت آن در کارسینوژنز این سرطانها دلالت دارد. افزایش بیان miR-107 در سرطان معده به عنوان انکوژن و تنظیم کننده تهاجم و متاستاز تومور گزارش شده است.

اخیرا Li و همکاران نیز افزایش بیان miR-107 را در بافت سرطان معده گزارش دادند و پیشنهاد دادند که افزایش بیان با پیشرفت کلینیکی سرطان و افزایش تکثیر سلولی از طریق هدف قرار دادن FOX1 مرتبط است (18). علت این اختلاف در کاهش و افزایش بیان و نقش miR-107 در سرطان های مختلف نامشخص است، اما آنچه که احتمال می رود این است که نقش miR-107 در تکثیر سلولی، اختصاصی به بافت و یا سلول و ژن های مورد هدف پایین دست و محتویات سلولی مختلف در بافت های مختلف است. همانطور که ذکر شد حضور هیپوکسی در تومور های جامد باعث افزایش بیان یکسری از ژن ها می شود و در نهایت موجب به وجود آمدن رفتارهای تهاجمی تومور مانند متاستاز، پیش آگهی ضعیف و عدم پاسخ مناسب به درمان های رایج از جمله جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی می شود و این بیماران نیاز به یکسری درمان های ویژه دارند مانند استفاده از یکسری مواد شیمیایی شناخته شده که بیان ژن های موثر در ایجاد رفتارهای تهاجمی را کاهش می دهند. بنابراین در مرحله اول آگاهی از حضور هیپوکسی در تومور می تواند در انتخاب روش درمانی موثر و مفید است. بررسی مارکر ها در بافت بیوپسی تومور کاملا تهاجمی و گران است. بنابراین شناسایی بیومارکر غیر تهاجمی مانند miRNAهای ترشحی در سرم و پلاسما جهت آگاهی از هیپوکسی تومور بسیار ضروری است. افزایش بیان miR-107 در سرطان معده قبلا گزارش شده است اما تاثیر هیپوکسی بر این افزایش بیان در سرطان معده مطالعه نشده است. هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییرات بیان miR-107 در رده های سلولی سرطان معده MKN45 و AGS در شرایط القای هیپوکسی است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و القای هیپوکسی: رده‌های سلولی سرطان معده MKN45 و AGS از انستیتوپاستور ایران تهیه شدند. رده‌های سلولی در محیطی متشکل از RPMI-1640، FBS 10% و 1% پن‌استرپ در 37°C و انکوباتور 5% CO_2 کشت داده شدند. جهت القای هیپوکسی رده های سلولی در شرایط 95%N_2 و 5%CO_2 کشت داده شدند.

استخراج RNA تام سلولی: به منظور بررسی بیان HIF-1α و miR-107 ابتدا استخراج RNA تام سلولی از رده‌های سلولی سرطان معده توسط محلول RiboEX(GeneAll, Korea) طبق دستور العمل شرکت سازنده صورت گرفت. غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (GeneQuest, UK) بررسی گردید.

سنجش میزان بیان HIF-1α به روش Real-time PCR: واکنش رونویسی معکوس بر روی 500 نانوگرم RNA، با استفاده از کیت cDNA synthesis kit(Takara,Japan) انجام گرفت. میکروتیوب‌ها به مدت 15 دقیقه در دمای 37°C انکوبه شدند، سپس جهت غیر فعال کردن آنزیم به مدت 5 دقیقه در دمای 85°C انکوبه شدند. برای انجام واکنش real-time PCR از کیت ExiLent SYBR Green master mix(Takara, Japan) استفاده شد. از GAPDH نیز جهت کنترل داخلی برای نرمالیزاسیون استفاده شد. محصولات PCR طبق برنامه دمایی شامل 30 ثانیه در 95°C و متعاقب آن 40 سیکل شامل 95°C به مدت 3 ثانیه و 60°C به مدت 60 ثانیه در دستگاه ABI 7500 real-time quantitative PCR system (Applied biosystems, USA) تکثیر پیدا کردند. برای اطمینان از عدم آلودگی با DNA ژنومی یک واکنش فاقد RT و بررسی صحت تکثیر از کنترل منفی که فاقد cDNA بود نیز در هر چرخه استفاده شد. هر یک از آزمایشات بررسی بیان HIF-1 α دو بار تکرار شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در زیر آمده است:

HIF-1α (F-TGACCTGCTTGGTGCTGATT / R-AGCGGCCTAAAAGTTCTTCTG)

GAPDH (F- ATGGGGAAGGTGAAGGTCG / R-GGGGTCATTGATGGCAACAATA)

سنجش میزان بیان miR-107 به روش Real-time PCR: واکنش رونویسی معکوس بر روی 200 نانوگرم RNA، با استفاده از کیت

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]

miRCURY LNA™ Universal RT (Exiqon, Denmark) microRNA PCR Kit انجام گرفت. میکروتیوب‌ها به مدت 60 دقیقه در دمای 42 ºC انکوبه شدند، سپس جهت غیر فعال کردن آنزیم به مدت 5 دقیقه در دمای 95 ºC انکوبه شدند.

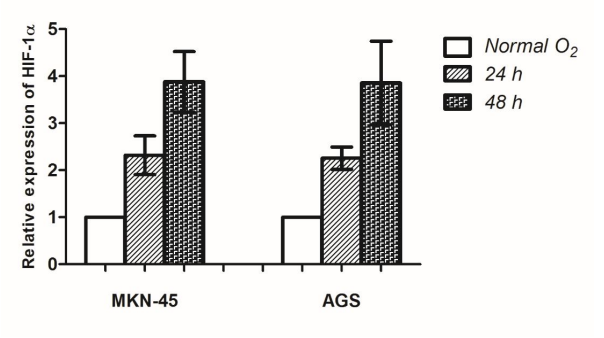
برای انجام واکنش real-time PCR با روش SYBR Green از 1 میکروگرم محصول cDNA، پرایمرهای miR-LNA™107 و کیت ExiLent SYBR Green master mix (Exiqon, Denmark) استفاده شد. از srRNA 5 نیز جهت کنترل داخلی برای نرمالیزاسیون استفاده شد. محصولات PCR طبق برنامه دمایی شامل 10 دقیقه در 95 ºC و متعاقب آن 40 سیکل شامل 95 ºC به مدت 10 ثانیه و 60 ºC به مدت 1 دقیقه در دستگاه ABI 7500 real-time quantitave PCR system (Applied biosystems, USA) تکثیر پیدا کردند. هریک از آزمایشات بررسی بیان miR-107 دوبار تکرار شد. برای اطمینان از عدم آلودگی با DNA ژنومی یک واکنش فاقد RT و بررسی صحت تکثیر از کنترل منفی که فاقد cDNA بود نیز در هر آزمایش استفاده شد.

آنالیز آماری داده ها: وضعیت بیان miR-107 و HIF-1α مورد مطالعه در نمونه‌های سلولهای سرطان معده با نرم افزار Graphpad Prism 6 و روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تحلیل شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت‌های مشاهده شده از آزمون T student استفاده شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

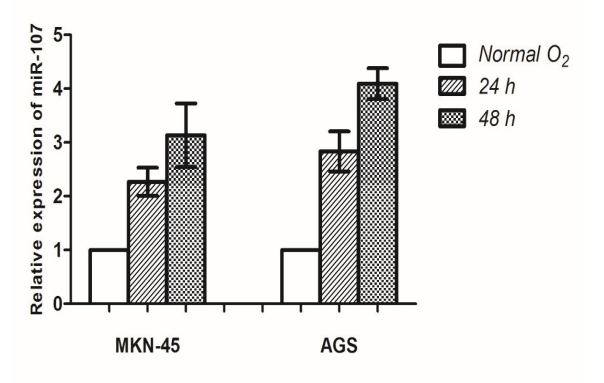
یافته ها

بیان HIF-1α در رده های سلولی سرطان معده MKN45 وAGS: بررسی های آماری داده ها نشان داد که القای هیپوکسی در رده‌های سلولی MKN45 و AGS موجب افزایش بیان HIF-1α می‌گردد. میزان بیان HIF-1α در سلول‌های MKN45 در 24 و 48 ساعت پس از القای هیپوکسی نسبت به شرایط نرمال اکسیژن به ترتیب 2/3 و 3/8 برابر افزایش بیان داشت. میزان بیان در 24 و 48 ساعت تفاوت معنی‌داری نشان داد (به ترتیب p=0/002 وp=0/04) (نمودار 1). همچنین میزان بیان HIF-1α در سلول‌های AGS در 24 و 48 ساعت پس از القای هیپوکسی به ترتیب 2/2 و 3/8 برابر افزایش بیان داشت. میزان بیان در 24 و 48 ساعت نسبت به شرایط نرمال اکسیژن نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد (به ترتیب p=0/005 و p=0/03) (نمودار 1).

بیان miR-107 در رده‌های سلولی سرطان معده MKN45 و AGS: بیان miR-107 در سلولهای MKN45 که تحت شرایط هیپوکسی کشت داده شدند، در 24 و 48 ساعت پس از القای هیپوکسی نسبت به سلولهای کشت شده در شرایط نرمال اکسیژن به ترتیب 2/2 و 3/1 افزایش یافت. میزان بیان در 24 و 48 ساعت نسبت به شرایط نرمال اکسیژن نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد (به ترتیب p=0/0001 و p=0/01) (نمودار 2). همچنین تکرار این آزمایش برای سلولهای AGS نشان دهنده افزایش 2/8 و 4 برابر بیان miR-107 بعد از 24 و 48 ساعت پس از القای هیپوکسی بود. در این رده سلولی نیز میزان بیان در 24 و 48 ساعت نسبت به شرایط نرمال اکسیژن تفاوت معنی‌داری داشت (به ترتیب p=0/0001 و p=0/002) (نمودار2).



نمودار 1. مقایسه میزان بیان HIF-1α در سلول‌های MKN45 و AGSدر شرایط هیپوکسی



نمودار 2. مقایسه میزان بیان miR-107 در سلول‌های MKN45 و AGS در شرایط هیپوکسی

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق القای هیپوکسی در رده های سلولی سرطان معده منجر به افزایش بیان miR-107 شد که با افزایش زمان هیپوکسی از 24 ساعت به 48 ساعت میزان بیان HIF-1α نیز افزایش پیدا کرد. HIF-1α یکی از زیر واحدهای فاکتور HIF است که در شرایط اکسیژن نرمال ناپایدار است و تجزیه می‌شود، ولی در شرایط هیپوکسی که از ویژگی‌های بارز تومورهای جامد می باشد، پایدار است و باعث ایجاد رفتارهای ویژه در تومور می‌شود (9). با توجه به این مطالب، افزایش بیان HIF-1α پس از القای هیپوکسی نتیجه قابل انتظار و دلیلی بر تایید القای هیپوکسی در رده‌های سلولی MKN45 و AGS است. مطالعات مختلفی نقش‌های مختلف miRNAها را به عنوان تنظیم کننده‌های عملکردهای مختلف سلولی، انکوژن یا سرکوبگر تومور در ایجاد و پیشرفت تومور ثابت کرده است (19). مطالعات متعددی منجر به شناخت گروهی از miRNA های تنظیم شونده توسط هیپوکسی (HRMs) شده است. گروه HRM شامل ۱۰۳،۹۳، 30b، 27a، 26b، 26a، 24، 23b، 23a، miR-21، 213، 210، 195، 192، 181abc، 125b، 107، 106a است که در سرطان سینه و کلون در پاسخ به هیپوکسی القا می شوند(10). اگرچه بررسی miRNAها به طور گسترده در سرطان‌های مختلف صورت گرفته است، اما تغییرات miRNAها و عملکرد آنها در سرطان معده کمتر مطالعه شده است. miR-107 در ابتدا به عنوان سرکوبگر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]

تومـور در سـرطان‌هـای مثانـه، پـانکراس، کولـون، سـر و گـردن شـناخته شد(21و20و14). افزایش بیان miR-107 در سلول‌های سرطانی پانکراس باعث کاهش سطح CDK6 و مهار رشد سلول می شود (14). همچنین ثابت شده در سلول‌های سرطان معده miR-107 با هدف قرار دادن CDK6 باعـث مانـدن سلول‌ها در فاز G1 سیکل سلولی می‌شود و از این طریق باعث مهار تهاجم تومور می‌شود (22). علاوه بر موارد ذکر شده، miR-107 باعـث مهـار رشـد سـرطان کلون می‌شود (21). افزایش بیان معنی‌دار miR-107 در سلول‌های توموری غیر ductal سرطان پانکراس می شود (23). با این حال نتایج تحقیقات متعددی بر نقش miR-107 بـه عنـوان انکـوژن در سـرطان پسـتان اشـاره دارد (25و24). افزایش بیان miR-107 با متاستاز و پیش آگهی ضعیف در سرطان پستان ارتباط دارد. افزایش بیان miR-107 در سلول‌های اپیتلیال پستان باعث تبدیل آن‌ها به سلول های مزانشیمی می‌شـود و در نهایـت منجـر بـه رفتـار متاسـتاز از طریـق DICER1 می شود (24).

مطالعات مختلفی نیز افزایش بیان miR-107 را در سرطان‌های مختلف از جمله، معده، مری، کلون، هپاتوسلولار و پانکراس بیـان کـرده انـد و نقـش ایـن miRNA را به عنوان فاکتور مثبت در ایجاد سرطان پیشنهاد می‌دهند (17-13). miR-107 به عنوان miRNAای که تهـاجم و متاسـتاز را در سـرطان معـده تنظیم مـی‌کنـد شـناخته شـده اسـت (13). Inoue و همکـاران افـزایش بیـان miR-107 را در بافت تومور معده در مقایسه با بافت سالم مجاور تومـور نشـان دادند و ثابت کردند بیان آن با مقدار تهاجم، متاستاز به عقده لنفاوی و درجه تومور ارتباط مسـتقیم دارد (26). اخیـرا Li و همکـاران بـا نشـان دادن افـزایش بیـان miR-107 در تومور معده پیشنهاد نمودند که ایـن افـزایش بیـان بـا پیشـرفت کلینیکی و افزایش رشد سلول‌های توموری از طریق FOXO1 ارتباط دارد(18). همان‌طور که ذکر شد افزایش و کاهش بیان miR-107 در تومورهای مختلـف ذکر شده است. اگرچه دلیل این تناقض نامشخص است، آنچه که واضح است این است که نقش miR-107 در رشد سلولی، وابسته و اختصاصی بـه هـر بافـت و سلول است که می‌تواند در نتیجه عوامل داخل سلول و ژن‌های هدف متغیر باشد. بنابراین نقش و مکانیسم miR-107 در تومورهای مختلف نیاز به مطالعات بیشتر و استفاده از مدل‌های ویژه بافتی دارد. به طور کلی تومورهایی که دچار هیپوکسی شده اند، پیش اگهی وخیم دارند و نسبت به درمان‌های رایج مانند شیمی درمانی و پرتو درمانی مقاومند، و جهت درمان این بیماران باید از یک سری از درمان‌هـای ویژه مثل مهار بیـان ژن هـای مسـئول در ایجـاد رفتارهـای خـاص تومورهـای هیپوکسیک بهره برد. miRNAها با میانجی‌گری مسیرهای اپی‌ژنتیـک باعـث فراهم آمدن چنین فنوتیپی می‌شوند (27). miR-107 یکی از miRNAهـایی است که در پاسخ به هیپوکسی در سلول سرطانی القا می‌شود، با این حال مطالعات بسیار اندکی در مورد ارتباط هیپوکسی بر بیان آن صورت گرفتـه اسـت. افـزایش بیان miR-107 در پاسخ به هیپوکسی در سلول‌هـای سـرطانی سـینه و کلـون گزارش شده است (10).

با این که سرطان معده از تومورهای جامد شایع است و هیپوکسـی نیـز از ویژگی‌های بارز آن است، اما هیچ گزارشی مبنـی بـر تـاثیر هیپوکسـی بـر بیـان miR-107 در سلولهای تومور معده گزارش نشده است. در این مطالعه ارتباط بین هیپوکسی و افزایش بیان miR-107 در سلول‌های سرطان معده MKN45 و AGS شناسایی شد. بر اساس یافته‌های این تحقیق، می‌توان نتیجه گیری کرد که miR-107 قابلیت آن را دارد که به عنوان بیومارکر در تشـخیص سـرطان معده و آگاهی از وضعیت هیپوکسیک تومور و انتخاب روش مناسـب درمـانی در مورد تومور هیپوکسیک معده به کار رود اما جهت اثبات این قابلیت miR-107، تحقیقات و مطالعات بیشتری باید انجام پذیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه تربیت مدرس جهت حمایت های مالی تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]

An Investigation of the Effect of Hypoxia on Expression of 107-miR in Gastric Cancer Cell Lines MKN-45 and AGS

N. Ayremlou (DVM)[1], H. Mozdarani (PhD)[*1], S.J. Mowla (PhD)[2], A. Delavari (MD)[3]

1.Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran
2.Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran
3.Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(10);Oct 2015; PP:39-45
Received: Feb 27th 2015, Revised: May 6th 2015, Accepted: Jul 29th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Hypoxia in solid tumors is the major cause of cancer treatment resistance. Thus, identifying the appropriate indicators of hypoxia in tumors is of great importance for appropriate tumor prognosis and choosing the best treatment methods. This study aims to investigate the modulation of miR-107 expression, as a biomarker of hypoxia and its association with gastric cancer cells.

METHODS: MKN45 and AGS gastric cancer cells were purchased from Tehran Pasteur Institute and then, were cultured under normal oxygen conditions (CO_2 5% and O_2 95%) and hypoxia (CO_2 5% and N_2 95%). Finally, miR-107 and HIF-1-α expressions were evaluated every 24 to 48 hours.

FINDINGS: The results of the study showed that through hypoxia induction, HIF-1-α expression in MKN-45 cell lines increased by extending treatment duration (24 and 48 hours) 2.3 and 3.8 times, respectively, (p=0.04 and p=0.002), and in AGS cell lines HIF-1-α expression increased 2.2 and 3.8 times (p=0.03 and p=0.005). In addition, miR-107 expression in MKN-45 increased during this time by 2.2 and 3.1 times (p=0.01 and p=0.0001), while in AGS cell lines it was by 2.4 and 4 times (p=0.002 and p=0.0001).

CONCLUSION: It was demonstrated that hypoxia induction in gastric cancer cells could modulate the expression of miR-107.

KEY WORDS: *Gastric cancer, HIF-1-alpha, Hypoxia, miR-107.*

Please cite this article as follows:

Ayremlou N, Mozdarani H, Mowla SJ, Delavari A. An Investigation of the Effect of Hypoxia on Expression of 107-miR in Gastric Cancer Cell Lines MKN-45 and AGS. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(10):39-45.

[*] Corresponding Author: H. Mozdarani (PhD)
Address: Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 82883830
Email: mozdarah@modares.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]

References

1.Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127:2893-917.

2.Zabaleta J. Multifactorial etiology of gastric cancer. Methods Mol Biol. 2012;863:411-35.

3.Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. Postgrad Med J. 2005;81(957):419-24.

4.Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med. 2000;343(2):78-85.

5.Vaupel P, Hockel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO2 histography. Antioxid Redox Signal. 2007;9(8):1221-35.

6.Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Natl Cancer Inst. 2001;93(4):266-76.

7.Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer.2003;3(10):721-32.

8.Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. Expert Rev Mol Med. 2009;11:e26.

9.Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(17):9630-5.

10.Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. Mol Cell Biol. 2007;27(5):1859-67.

11.Li XY, Luo QF, Wei CK, Li DF, Li J, Fang L. MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer .Int J Clin Exp Med. 2014;7(1):32-40.

12.Chen HY, Lin YM, Chung HC, Lang YD, Lin CJ, Huang J, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. Cancer Res. 2012;72(14):3631-41.

13.Li X, Zhang Y, Shi Y, Dong G, Liang J, Han Y, et al. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer. J Cell Mol Med. 2011;15(9):1887-95.

14.Lee KH, Lotterman C, Karikari C, Omura N, Feldmann G, Habbe N, et al. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. Pancreatology. 2009;9(3):293-301.

15.Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:2257-2261.

16.Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res. 2008;68(1):26-33.

17.Huang XH, Wang Q, Chen JS, Fu XH, Chen XL, Chen LZ, et al. Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated. Hepatol Res. 2009;39(8):786-94.

18.Li F, Liu B, Gao Y, Liu Y, Xu Y, Tong W, et al. Upregulation of microRNA-107 induces proliferation in human gastric cancer cells by targeting the transcription factor FOXO1. FEBS Lett. 2014;588(4):538-44.

19.Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. Br J Cancer. 2006;94(6):776-80.

20.Datta J, Smith A, Lang JC, Islam M, Dutt D, Teknos TN, et al. microRNA-107 functions as a candidate tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma by downregulation of protein kinase Cvarepsilon. Oncogene. 2012;31(36):4045-53.

21.Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, Hruban RH, Karim B, Mendell JT, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(14):6334-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]

22.Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. miR-107 targets cyclin-dependent kinase 6 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in gastric cancer cells. Med Oncol. 2012;29(2):856-63.
23.Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. J Clin Oncol. 2006;24(29):4677-84.
24.Chen PS, Su JL, Cha ST, Tarn WY, Wang MY, Hsu HC, et al. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. J Clin Invest. 2011;121(9):3442-55.
25.Cicatiello L, Mutarelli M, Grober OM, Paris O, Ferraro L, Ravo M, et al. Estrogen receptor alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs. Am J Pathol. 2010;176(5):2113-30.
26.Inoue T, Iinuma H, Ogawa E, Inaba T, Fukushima R. Clinicopathological and prognostic significance of microRNA-107 and its relationship to DICER1 mRNA expression in gastric cancer. Oncol Rep. 2012;27(6):1759-64.
27.Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. Virchows Arch. 2008;452(1):1-10.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.6.1]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.39]