

تأثیر سیکلوفسفامید بر میزان بیان miRNA-15a در سلول B ترانسفورم شده با ویروس اپشتاین بار

نویسندگان:

عبدالرضا ستوده جهرمی^۱، محمد کارگر^۱، ملیحه مرادزاده^{۲*}، فرشید کفیل زاده^۱، مرضیه جمالی دوست^۳

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲- مرکز تحقیقات روماتولوژی گلستان، بیمارستان صیاد شیرازی گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۳- مرکز تحقیقات میکروب شناسی، بیمارستان نمازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

چکیده:

مقدمه: با وجود پیشرفت در تشخیص و درمان، هنوز سرطان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در دنیا محسوب می‌شود. سیکلوفسفامید به عنوان یکی از داروهای مهم در درمان سرطان است. با این حال، هنوز اثرات ضد لنفومای سیکلوفسفامید به ویژه در لنفوم‌های سلول B بر روی بیان miRNA مشخص نیست. هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر سیکلوفسفامید روی سایتوتوکسیسیته و بیان miRNA-15a در لنفوم سلول B آلوده به ویروس اپشتاین بار (EBV) بود.

روش کار: در این مطالعه، تأثیر سیکلوفسفامید بر رده سلولی CO 88BV59-1 LCL که نوعی سلول B آلوده به ویروس EBV است، مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها به مدت سه روز با سیکلوفسفامید (۰/۰۵ تا ۵۰ میکرومول) تحت درمان قرار گرفتند. میزان زنده ماندن و مرگ سلولی به ترتیب به روش MTT و فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p توسط Real-Time PCR تعیین شد.

یافته‌ها: سیکلوفسفامید به طور قابل توجهی باعث مهار تکثیر و آپوپتوز در سلول‌های آلوده به EBV به صورت وابسته به دوز و زمان شد ($P < 0/05$). در سلول‌های تیمار شده با سیکلوفسفامید تغییر معناداری در میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده مشاهده نشد ($P > 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که تأثیر سایتوتوکسیسیته سیکلوفسفامید در کاهش زنده ماندن و افزایش مرگ سلولی سلول‌های B (CO 88BV59-) مستقل از تأثیر روی میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p است.

واژگان کلیدی: سیکلوفسفامید، سلول B، میکرو آر آن آ، ویروس اپشتاین بار

Pars J Med Sci 2021;19(1):1-9

مقدمه:

شیوع ویروس اپشتاین بار به عنوان یکی از خانواده هرپس گاما ویروس‌ها در جامعه بیش از ۹۰ درصد است [۱، ۲]. این ویروس با تکثیر بی‌رویه سلول‌های B در شرایط بدن و به دنبال عفونت و ضعف سیستم ایمنی باعث بیماری لنفوپرولیفراتیو شده و با بدخیمی‌های سلول B از جمله لنفوم هوچکین (HL)، لنفوم بورکیت (BL) و بیماری لنفوپرولیفراتیو پس از پیوند (PTLD)

همراه است. ویروس مذکور از طریق تغییر در بیان RNAهای کوچک (miRNA) - گروهی از RNAهای 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]. miRNAها در اصل RNAهای ۲۳-۱۸ نوکلئوتیدی غیر کدکننده هستند که بیان ژن را در مرحله پس از رونویسی تنظیم می‌کنند.

* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات روماتولوژی گلستان، بیمارستان صیاد شیرازی گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

تلفن تماس: ۰۹۱۱۲۷۹۱۳۸۲ - فکس: ۰۱۷۳۲۲۳۹۷۹۱

پست الکترونیک: moradzadeh63@yahoo.com

اصلاح: ۱۳۹۹/۱۲/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۷

دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۷

روش کار:

لنفوسیت‌های B سرطانی آلوده به EBV رده CO 88BV59-1 با کد سلولی CRL-10624 از ATCC خریداری شدند. سیکلوفسفامید از شرکت سیگما و دیگر مواد لازم از جمله تریپسین (Trypsin-EDTA)، MTT، محیط کشت (RPMI 1640)، آنکسین (Annexin-V-FITC) و پروپیدیوم آبودید (Propidium Iodide, PI) از شرکت مرک، کیت استخراج (RNA extraction Kit (TRIZOL reagent) و کیت RT-PCR از شرکت روش (Roche) خریداری شدند.

پژوهش حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.JUMS.REC.1399.026 به تصویب رسیده است.

تعیین میزان سلول‌های زنده به روش MTT

برای تعیین غلظت کافی از سیکلوفسفامید که باعث مرگ سلولی در نیمی از سلول‌ها (IC50) می‌شود از آزمایش MTT استفاده شد. ابتدا سلول‌های رده CO 88BV59-1 در محیط کشت RPMI 1640 که با FBS ده درصد غنی شده و حاوی غلظت‌های یک درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین بود، در دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۰٪ و دی اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند و پس از رسیدن هم پوشانی سلول‌ها به نزدیک ۸۰٪، سلول‌ها را با تریپسین جمع آوری و پس از شستشو، در پلیت‌های ۹۶ خانه ای با غلظت ۳×۱۰^۵ کشت داده شدند.

پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت با محیط حاوی سیکلوفسفامید با غلظت‌های مختلف (۰/۰۵ تا ۵۰ میکرومول) جایگزین و سلول‌ها با سیکلوفسفامید تیمار شدند. محیط کشت سلول‌های گروه کنترل تنها حاوی دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) بود. ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از تیمار، سلول‌های گروه‌های آزمایش و کنترل با PBS شستشو و محلول MTT برای مدت چهار ساعت به آن‌ها اضافه شد. پس از آن، کریستال‌های رنگی ایجاد شده با DMSO حل شده و میزان رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شدند.

تعیین سلول‌های آپوپتوتیک به روش فلوسیتومتری

برای تعیین میزان آپوپتوز سلولی، سلول‌های رده CO 88BV59-1 در پلیت‌های ۲۴ خانه با غلظت ۳×۱۰^۵ کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت اولیه با محیط کشت حاوی سیکلوفسفامید متناسب با IC50 زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جایگزین شد. در گروه کنترل تنها DMSO وجود داشت. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، تمام سلول‌ها با استفاده از تریپسین جمع آوری و با محلول PBS شستشو داده

نزدیک به یک سوم بیان ژن‌های بدن انسان توسط miRNA تنظیم می‌شود [۵]. miRNA ها ارتباط نزدیکی با بیماری‌های مختلف از جمله سرطان دارند [۴].

با توجه به گستره‌ای از پروتئین‌هایی که بیان‌شان توسط miRNA تنظیم می‌شود، miRNA تقریباً در تنظیم همه فرآیندهای زیستی از جمله تکوین و شکل‌گیری اندام‌ها و دستگاه‌های بدن [۶]، حفظ حالت خودتکثیری در سلول‌های بنیادی و تنظیم تمایز آن‌ها به انواع سلول‌های دیگر [۷]، رشد، آپوپتوز [۸]، تنظیم و تکوین سیستم ایمنی [۹]، تومورزایی [۱۰] سرکوب تومور، متاستاز و مقاومت دارویی [۱۱] نقش ایفا می‌کنند. کاهش و یا حذف miRNA-15a3p و miRNA-15a5p که در جایگاه ژنی 13q14 قرار داشته و به عنوان یک miRNA سرکوبگر تومور و تنظیم کننده‌های منفی پروتئین BCL-2 هستند منجر به لنفوم سلول B می‌شود [۱۲، ۱۳].

در بیشتر سلول‌های آلوده به EBV، کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-15a مشاهده شده است که این اتفاق فعالیت ژن BCL-2 را افزایش داده و در نتیجه باعث افزایش فعالیت و تکثیر بی‌رویه سلول‌های توموری [۱۴]، کاهش آپوپتوز و نامیرایی سلول می‌شود [۱۵].

بیماری PTLD به دلیل ورود EBV از طریق دهنده پیوند EBV+ به گیرنده پیوند رخ می‌دهد. حتی ممکن است فرد گیرنده پیوند قبل از دریافت پیوند به خاطر آلودگی قبلی به ویروس مذکور آن را به صورت نهفته در بدن خود داشته و به دلیل فعال شدن ویروس در نتیجه تضعیف سیستم ایمنی، بیماری مذکور رخ دهد [۲].

داروهای ضد ویروسی همچون اسیکلوویر و گانسیکلوویر که برای درمان بقیه اعضای این خانواده استفاده می‌شود، برای عفونت‌های حاصل از این ویروس نیز می‌تواند به کار گرفته شوند، اما در درمان PTLD کارایی چندانی ندارند. سیکلوفسفامید یکی از داروهای شیمی درمانی است که در درمان اختلالات لنفوپرولیفراتیو و سایر لنفوم‌ها از جمله بورکیت، هوجکین و لنفوم سلول B بزرگ منتشره و PTLD استفاده می‌شود [۱۶].

از آن جایی که تا کنون تاثیر سیکلوفسفامید روی بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در لنفوم آلوده به EBV مورد بررسی قرار نگرفته است، این پژوهش با هدف تعیین اثر سیکلوفسفامید روی سایتوتوکسیسیته و بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p بر روی سلول B آلوده به EBV (رده سلولی CO 88BV59-1) انجام شد.

یک میکرولیتر cDNA، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد (۱۰ میکرومولار)، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس (۱۰ میکرومولار) (جدول ۱)، ۲۵ میکرولیتر SYBR mix و ۲۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. به منظور خارج کردن حباب های هوا از درون میکروتیوب ها، پلیت حاوی میکروتیوب ها به مدت یک دقیقه در دور $1000 \times g$ سانتیفریوژ شد. سپس پلیت مذکور برای بررسی واکنش PCR و تشخیص میزان فلورسنت در دستگاه QIAGEN Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany) قرار داده شد.

برنامه دمایی دستگاه به صورت زیر تعیین شد:

مرحله اولیه فعال سازی PCR به مدت ۱۰ دقیقه و دمای 95°C که در آن آنزیم Hot Star Taq DNA پلی مراز فعال می شود. مرحله دوره ای شامل دناتوراسیون ۱۵ ثانیه در 95°C ، آنیلینگ ۴۵ ثانیه در 60°C و طولیل شدن ۳۰ ثانیه در 72°C بود و این سیکل به تعداد ۴۰ بار تکرار شد [۱۷].

بیان نسبی mi-RNAها با استفاده فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ به صورت زیر محاسبه شدند.

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

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

تحلیل آماری

آزمون های مربوط به هر نمونه به صورت سه تایی انجام و داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شدند. تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون واریانس یک طرفه انجام شد. در تمام آزمون ها سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

شده و سپس با Annexin-V و PI رنگ آمیزی و سلول های آپوپتوتیک با دستگاه فلوسیتومتر (BD, USA) FACSCalibur شمارش شدند.

در این روش، سلول هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin را گرفته و سلول هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده و دیواره سلولی آن ها اندکی نفوذ پذیر شده بودند با دو رنگ Annexin و PI رنگ شده و سلول هایی که دچار نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند.

تعیین میزان بیان mi-RNA با RT-PCR

پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار سلول ها، تمام RNA سلول ها به وسیله کیت RNeasy طبق پروتکل مربوط استخراج و به منظور حذف DNA ژنومی، RNA به دست آمده با کیت RNase-free DNase تیمار شد. غلظت RNA به دست آمده در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد [۱۷]. از نمونه هایی 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 (USTL miRNA 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. برای دناتوراسیون، ۱۰ دقیقه در 70°C و سپس روی یخ قرار داده شدند. چهار میکرولیتر از بافر $5 \times \text{RT}$ ، چهار میکرو لیتر 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 42°C به مدت یک ساعت انکوبه شده و سپس ۱۰ دقیقه در 90°C قرار داده شد. cDNA حاصل بعنوان یک cDNA کلی برای بررسی میزان بیان هر دو نوع miRNA-15a3p و miRNA-15a5p به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. هر تیمار سلولی در هر یک از زمان های تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) سه بار تکرار شد و برای هر تکرار سه بار آزمایش مذکور انجام شد.

آزمایش Real-time PCR با استفاده از کیت Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG شرکت Invitrogen بر طبق دستورالعمل مربوط انجام شد. به طور خلاصه هر واکنش شامل

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده برای hsa-miR-15a [۱۷]

mi-RNA	سکانس	دما (°C)
USTL primer	5-GAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAA GAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCNNNNNNNN-3	۹۰
hsa-miR-15a-3p	5-CAGGCCAUUUUGUGCUGCCUCA-3	
hsa-miR-15a-3P-F primer	5-ACACTCCAGCTGGGCAGGCCATATTGTGCTGCCTC-3	۶۰
hsa-miR-15a-5p	5-UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG-3	
hsa-miR-15a-5P-F primer	5-ACACTCCAGCTGGGTAGCAGCACATAATGGTTTGT-3	۶۰
Universal Revers primer	5-TGGTGTTCGTGGAGTCG-3	۵۹/۸
U6 internal control F primer	5-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3	۵۹/۱
U6 internal control R primer	5-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3	۵۹/۱

یافته‌ها:

بررسی میزان سلول‌های زنده با استفاده از MTT

سیکلوفسفامید به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان میزان زنده مانی رده سلولی را کاهش داد. با افزایش غلظت سیکلوفسفامید درصد بقای سلولی کاهش یافت به طوری که کمترین زنده مانی سلولی در غلظت ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میکرومولار و در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد ($P < 0.001$) (نمودار ۱). میزان IC50 در زمان‌های مختلف انکوباسیون در نمودار ۱ نشان داده است.

بررسی میزان آپوپتوز سلولی به روش فلوسایتومتری

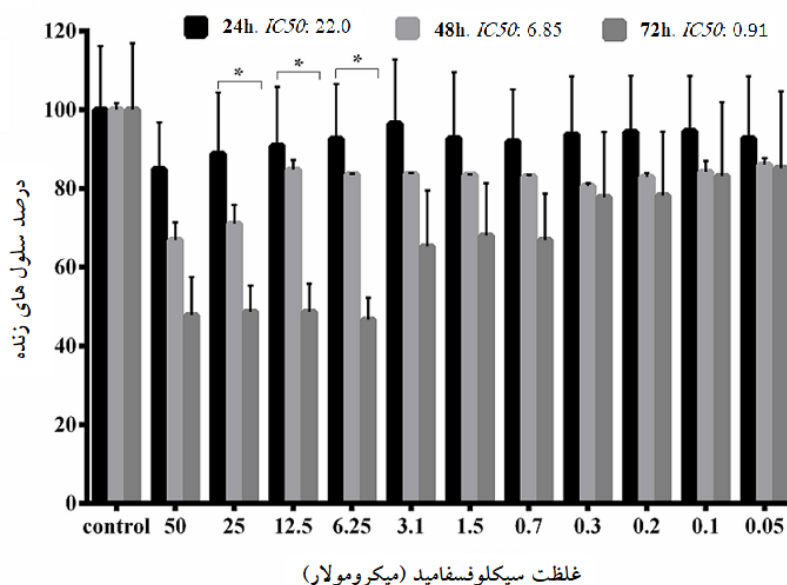
نتایج اثرات آپوپتوتیک سیکلوفسفامید روی رده سلولی CO LCL 88BV59-1، با توجه به مقادیر IC50 به دست آمده در

آزمایش MTT، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نمودار ۲ نشان داده شده است.

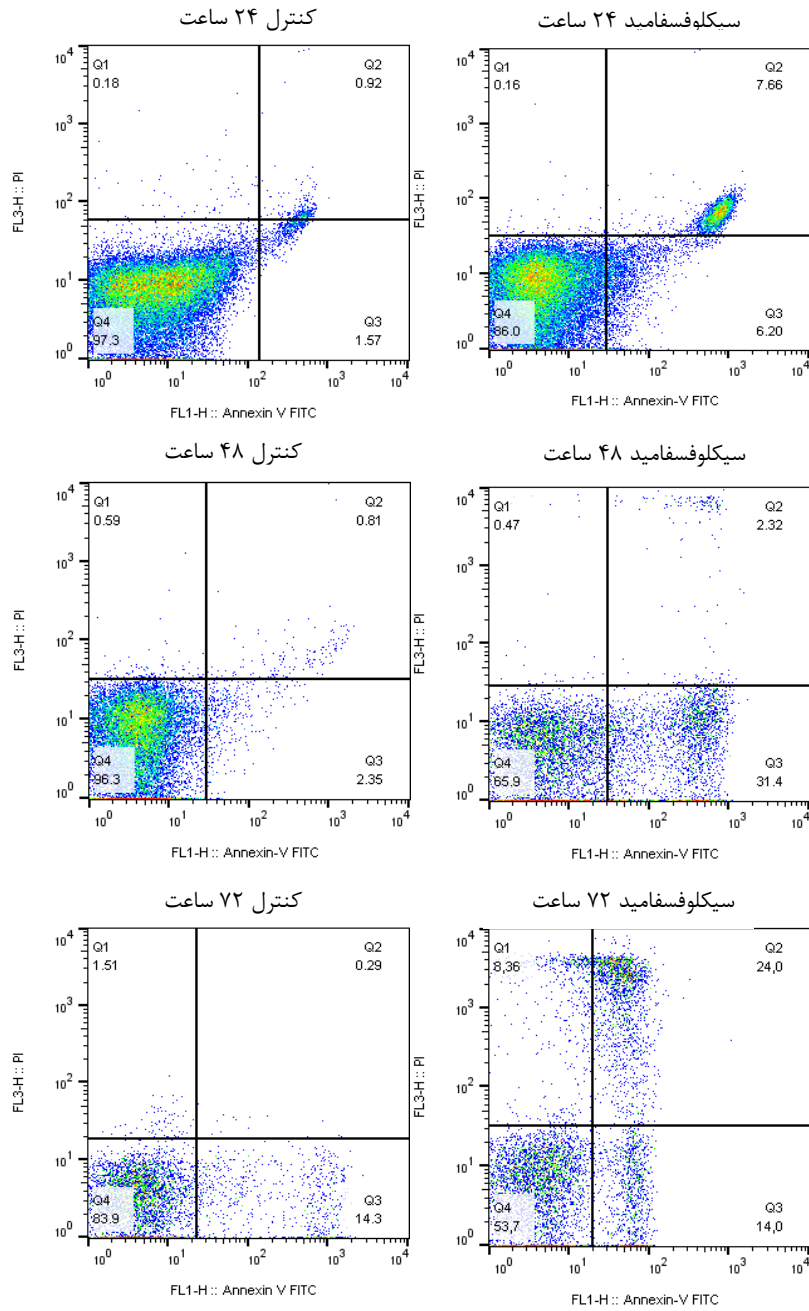
سیکلوفسفامید اثرات آپوپتوتیک قابل توجهی را در رده سلولی به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان نشان داد ($P < 0.001$). به طوری که بیشترین اثر آپوپتوتیک در IC50 برابر ۰/۹۱ و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت روی رده سلولی داشت (نمودار ۳).

بررسی تأثیر سیکلوفسفامید بر میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p با استفاده از Real Time-PCR:

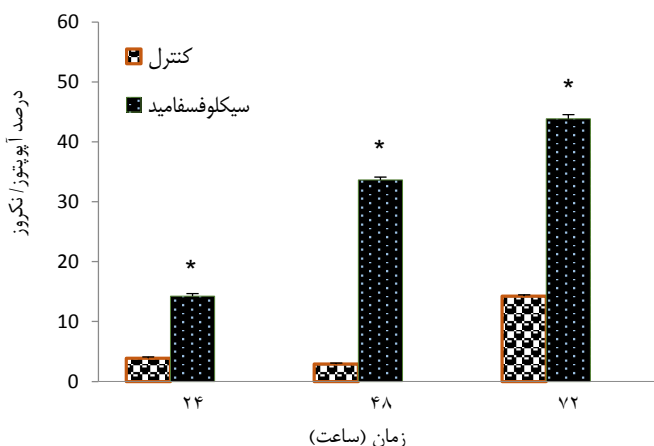
در نتایج Real Time PCR مشاهده شد که میزان بیان نسبی miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در رده سلولی تیمار شده با سیکلوفسفامید (با IC50 های مختلف) در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول کنترل، تفاوت آماری معناداری نداشت ($P > 0.05$) (نمودار ۴).



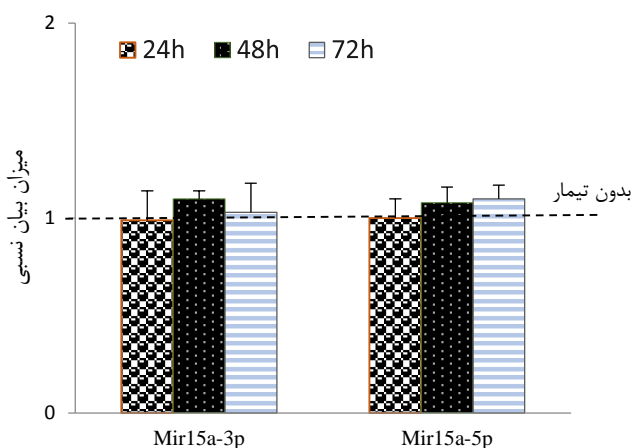
نمودار ۱: تأثیر سیکلوفسفامید بر زنده مانی رده سلولی



نمودار ۲: نتایج فلوسیتومتریک نشان دهنده القای آپوپتوزیس در رده سلولی تیمار شده با سیکلوفسفامید با IC₅₀ های مختلف در زمان های ۲۴ تا ۷۲ ساعت



نمودار ۳: تحلیل کمی آپوپتوزیس در رده سلولی تیمار شده با سیکلوفسفامید با IC_{50} های مختلف در زمان های ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون: تاثیر آپوپتوزی سیکلوفسفامید روی رده سلولی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری داشت ($P=0.01$).



نمودار ۴: میزان بیان نسبی miRNA-15a5p و miRNA-15a3p در رده سلولی تیمار شده با سیکلوفسفامید با IC_{50} های مختلف در زمان های ۲۴ تا ۷۲ ساعت

بحث:

سمیت سلولی و آپوپتوتیک سیکلوفسفامید با غلظت های مختلف علیه رده سلولی CO 88BV59-1 LCL که نوعی سلول B تغییر شکل یافته و آلوده شده با ویروس EBV است مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج پژوهش نشان داد که سیکلوفسفامید به طور قابل توجهی زنده مانی سلول های رده CO 88BV59-1 LCL را کاهش می دهد. این تاثیر با گزارش های قبلی منتشر شده در مورد خاصیت مهارتی سیکلوفسفامید و حتی درمانی در برابر سلول های مختلف توموری سازگار است [۱۶].

آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده یکی از فرآیند بیولوژیکی تحت کنترل ژن هاست که به منظور حذف سلول های نامطلوب در موجودات زنده به کار می رود [۲۱، ۲۰]. یکی از اثرات داروهای

در اختلالات لنفوپرولیفراتیو مرتبط با EBV تظاهرات بالینی ناهمگن دیده می شود و رفتارهای متغیری در پاسخ به درمان در آن ها مشاهده شده است [۱۹]. EBV از طریق تغییر در بیان miRNA های سلول های آلوده باعث نامیرا شدن و یا سرطانی شدن سلول آلوده می شود [۳]. این ویروس باعث کاهش بیان miRNA-15a شده و در نتیجه، بیان و فعالیت ژن BCL-2 افزایش پیدا می کند که خود باعث افزایش میزان تکثیر بی رویه سلول های توموری [۱۴]، کاهش آپوپتوز و نامیرایی سلولی می شود [۱۵].

سیکلوفسفامید یکی از داروهای شیمی درمانی است که در درمان اختلالات لنفوپرولیفراتیو استفاده می شود [۱۶]. تاکنون سازوکار اثر سیکلوفسفامید روی بیان miRNA-15a در لنفوم آلوده به EBV مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، در مطالعه حاضر اثرات

بر بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در لنفوم پژوهشی انجام نشده است.

نتیجه گیری:

یافته‌های این پژوهش نشان داد که سیکلوفسفامید به صورت وابسته به دوز و زمان باعث آپوپتوز در لنفوم سلول B آلوده به EBV می‌شود. همچنین اثر ضد تکثیر سیکلوفسفامید در لنفوم سلول B آلوده به EBV مستقل از تغییر در بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p است و احتمالاً تأثیر آن به افزایش بیان ژن‌های پیش-آپوپتوز و یا مهار بیان ژن‌های ضد-آپوپتوزی مربوط می‌شود.

با توجه به شیوع بالای این ویروس و اختلالات لنفوپرولیفراتیو و همچنین استفاده درمانی از سیکلوفسفامید و اثرات جانبی آن پیشنهاد می‌شود به منظور مشخص شدن سازوکار دقیق عملکرد داروی مذکور روی این بیماری و سلول‌های سرطانی دیگر در سطح ژنتیکی، پژوهش‌های بیشتری انجام شود.

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 تأیید آن تشکر می‌شود. همچنین از دکتر سعیده عرفانیان و دکتر محمد حجت فرسنگی برای همکاری در انجام مراحل مختلف این پژوهش قدردانی به عمل می‌آید.

ضد سرطان از جمله سیکلوفسفامید، القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است [۲۲، ۲۳].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار رده سلولی CO 88BV59- LCL با سیکلوفسفامید باعث مهار رشد این رده سلولی به صورت وابسته به زمان شد. این اثر ممکن است به دلیل افزایش بیان ژن‌های پیش-آپوپتوز و یا مهار بیان ژن‌های ضد-آپوپتوزی باشد.

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر با نتایج مطالعات قبلی که القای آپوپتوز اولیه و تاخیری در سلول‌های لنفوم تیمار شده با سیکلوفسفامید مورد بررسی قرار دادند [۲۴، ۲۵] هم‌خوانی دارد.

شواهد بسیاری نشان داده‌اند که miRNA-15a در اکثر موارد لنفوم‌های سلول B کاهش بیان داشته یا حذف شده‌اند. miRNA-15a به عنوان تنظیم کننده منفی پروتئین BCL2 عمل می‌کند که می‌تواند نشان دهنده سازوکار مولکولی باشد که در نتیجه کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-15a می‌تواند منجر به CLL شود [۲۶]. بنابراین، miRNA-15a می‌تواند سرکوبگر تومور باشد. در بیشتر سلول‌های آلوده به ویروس EBV، به علت کاهش فعالیت و یا حذف miRNA-15a، تکثیر تومور افزایش می‌یابد [۱۴].

در این مطالعه همچنین میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در سلول‌های تیمار شده با سیکلوفسفامید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در سلول‌های تیمار شده با سیکلوفسفامید تغییر معناداری در میزان بیان miRNA-15a3p و miRNA-15a5p در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده وجود ندارد. تأثیر سیتوتوکسیسیته سیکلوفسفامید بر سلول‌های توموری در مطالعات زیادی بررسی شده است [۲۴، ۲۵]، ولی در مورد تأثیر آن

References:

- Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(7):481-92.
- 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).
- 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.
- Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:3-14.
- Lewis BP, Shih I-h, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
- 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.
- 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.
- 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.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF-κB-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):2323-2330.
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. Hu W, Kavanagh J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *The lancet oncology*. 2004;4:721-9.
21. 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.
22. Alonso-Castro AJ, Ortiz-Sánchez E, García-Regalado A, Ruiz G, Núñez-Martínez JM, González-Sánchez I, et al. Kaempferitin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects. *J Ethnopharmacol*. 2013;145(2):476-89.
23. Schwartz PS, Waxman DJ. Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Molecular pharmacology*. 2001;60(6):1268-79.
24. 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.
25. 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.
26. Musilova K, Mraz M. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia*. 2015;29(5):1004-17.

Effect of Cyclophosphamide on miRNA-15a expression in EBV infected transformed B cell

Abdolreza Sotoodeh Jahromi¹, Mohammad Kargar¹, Maliheh Moradzadeh^{*2}, Farshid Kafilzadeh¹, Marzieh Jamalidoust³

Received: 2021.01.16

Revised: 2021.03.10

Accepted: 2021.03.17

1. Department of microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
2. Golestan rheumatology research center, Sayad shirazi hospital, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
3. Clinical microbiology research center, Namazi hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

Pars J Med Sci 2021;19(1):1-9

Abstract:

Introduction:

Despite advances in diagnosis and therapy of cancer, it is still the main cause of death worldwide. Cyclophosphamide is one of the major drugs for lymphoma treatment. However, the anti-lymphoma effects of cyclophosphamide on micro-RNA expression are still unclear, especially in B cell lymphomas. The aim of the present study was to evaluate the effect of cyclophosphamide on miRNA-15a genes expression in Epstein-Barr-Virus (EBV)-infected transformed B cell.

Material and Methods:

In this study, the effects of cyclophosphamide on CO 88BV59-1 LCL – an EBV infected transformed B cell was evaluated. The cells were treated with cyclophosphamide (0.05-50 μ M), for 3 days. The cell viability and cytotoxicity were evaluated using MTT, and flow cytometry techniques, respectively. Also, miRNA-15a genes expression were determined by real-time PCR.

Results:

Cyclophosphamide significantly inhibited proliferation and induced cell death in the 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 ($P > 0.05$).

Conclusions:

The results showed that cytotoxic effects of cyclophosphamide on CO 88BV59-1 LCL is not related to miRNA-15a3p and miRNA-15a5p expressions.

Keywords: Cyclophosphamide, Micro-RNA, B Cell, Epstein Barr Virus

* Corresponding author Email: moradzadeh63@yahoo.com