

انتقال siRNA نشاندار با لوتسیم به داخل سلول های سرطانی کولون با استفاده از لیپوزوم ها: مطالعه مقایسه ای

مجتبی فتحی^۱، محمد تقی خانی*^۲، محمد قنادی مراغه^۳، کمال یاوری^۴

^۱ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ استاد، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران

^۴ استادیار، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اثر خاموش سازی ژن با siRNA به طور قابل توجهی به یک روش مناسب جهت عرضه آن به سلول ها بستگی دارد. در پژوهش حاضر، اثر لیپوزوم ها در انتقال کمپلکس siRNA - ^{۱۲۵}Iu به سلول های سرطانی کولون به طور کمی مورد مطالعه قرار گرفته است. **مواد و روش ها:** siRNA با p-SCN-Bn-DTPA کونژوگه و با لوتسیم نشاندار شد. کمپلکس های siRNA - ^{۱۲۵}Iu پس از تخلیص با ستون های Vivaspin و سفادکس G25، به منظور تعیین در صد خلوص و سالم بودن به ترتیب با ITLC و PAGE بررسی شدند. siRNA های نشاندار با استفاده از لیپوفکتامین و siPORT Neo FX به سلول های سرطانی کولون ترانسفکت شدند، سپس در صد ترانسفکشن با شمارشگر گاما به طور کمی محاسبه گردید. از تصاویر میکروسکوپی و شمارش سلولی برای بررسی اثرات سیتوتوکسیک کمپلکس های نشاندار روی سلول های سرطانی استفاده شد.

یافته ها: ITLC نشان داد که خلوص کمپلکس های siRNA - ^{۱۲۵}Iu تولید شده، بیش از ۹۵٪ بود. در صد ترانسفکشن کمپلکس siRNA - ^{۱۲۵}Iu به سلول های سرطانی کولون توسط لیپوفکتامین در مقایسه با siPORT Neo FX به طور معنی دار بالا بود ($P < 0.01$). شمارش سلولی و تصاویر میکروسکوپی نشان داد که کمپلکس siRNA - ^{۱۲۵}Iu ضد IGF-1R اثر سیتوتوکسیک معنی داری روی سلول های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل دارد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: پژوهش حاضر نشان می دهد که کارایی لیپوفکتامین در انتقال کمپلکس siRNA - ^{۱۲۵}Iu به سلول های سرطانی کولون در مقایسه با siPORT Neo FX بیشتر است و siRNA - ^{۱۲۵}Iu ضد IGF-1R اثر سیتوتوکسیک بر روی سلول های سرطانی کولون دارد.

کلمات کلیدی: ترانسفکشن، سرطان کولون، رسپتور فاکتور رشد شبه انسولین نوع یک، RNA مداخله گر کوچک، لوتسیم، سیتوتوکسیک

مقدمه

سرطان کولون سومین سرطان شایع و دومین سرطان کشنده در جهان است که حدود ۱۰٪ از مرگ و میر های مربوط به سرطان را در سطح جهان به خود اختصاص داده است (۱).

رویکردهای متداول در درمان سرطان کولون، شامل پرتو-درمانی و شیمی درمانی است؛ ولی اثر آن ها در بقاء بیمار، به طور قابل توجهی پایین است. از این رو، در سال های اخیر روش های جدید بر اساس ژن درمانی برای درمان ارزیابی شده است. در فرآیند ژن درمانی، انتخاب یک روش مناسب جهت عرضه ژن به سلول های سرطانی و انتخاب ژن مناسب از پارامتر هایی هستند که اثر و نتیجه درمان به آن ها بستگی دارد (۱۱، ۱۴). RNA (RNAi) مداخله گر (جدیدترین تکنولوژی

آدرس نویسنده مسئول: گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

E-mail: taghi_mo@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۱۶

siRNA به سلول های سرطانی کولون توسط لیپوزوم ها به صورت کمی ارزیابی گردد. مطالعه حاضر، برای اولین بار، نشان داد که لیپوزوم کاتیونی لیپوفکتامین در انتقال RNA مداخله گر کوچک مولکول به رده سلول سرطانی کولون SW480 مؤثرتر از siPORT AMINE عمل می کند. از این رو، می تواند به عنوان ناقل siRNA در درمان سلول های سرطانی کولون در *in vitro* مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه تجربی شامل siRNA های حاوی هگزیمیل آمین در سمت 5 رشته آنتی سنس است که از شرکت MWG (Germany) خریداری شدند. رده سلول سرطانی sw480 (Carcinoma cell line of the colon) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط کشت سلولی RPMI 1640، سرم جنین گاوی (FBS) و ترسپسین- اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA) از شرکت گییکو (Germany) تهیه شدند. پلیت های کشت سلولی هم از شرکت نانک (Denmark) خریداری شد. محلول DEPC (diethyl-pyrocabonate) از شرکت سیگما (Germany)، ستون های Vivaspin از شرکت بیوتکنولوژی سارتوریوس (Germany)، ستون های PD-10 از شرکت آمرشام (Germany) خریداری شدند. دی اتیلن تری آمین پنتا-استیک اسید (p-SCN-Bn-DTPA) از شرکت مایکروسایکلک (USA)، SYBR® Green II RNA Gel Stain (Cat No: S-7564) از اینویترورژن (USA) تهیه شد. بقیه مواد مصرفی از شرکت سیگما تهیه شدند و کشت رده سلول های سرطانی در انکوباتور کشت سلولی (37 °C و 5% CO₂) انجام و برای اطمینان از حیات سلول ها، شمارش سلولی با تریپان بلو و لام نئوبار انجام شد. پاساژ سلول ها با تریپسین 0/25 درصد در PBS و 0/1 درصد EDTA صورت گرفت. بخشی از آزمایش ها در گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس و بخشی از آن در پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای در سال ۱۳۹۰ انجام شده است. تولید و تخلیص siRNA کونژوگه با شلاتور p-SCN-Bn-DTPA توالی های siRNA استفاده شده با وزن مولکولی حدود ۱۳/۵ کیلوالتون دو نوع هستند، یکی بر ضد IGF-1R که در سرطان کولون افزایش بیان دارد و دیگری بر ضد لوسیفراز که به عنوان کنترل

خاموش سازی ژن در سطح رونویسی است که در آن مولکول عمل کننده، یک RNA (siRNA مداخله گر کوچک مولکول) با طول ۲۱-۲۳ جفت باز است که پس از انتقال به داخل سلول، به یک کمپلکس پروتئینی به نام RISC (کمپلکس خاموش سازی القاء شده با RNA) متصل می گردد سپس با فعالیت هلیکازی دو رشته siRNA باز می گردد. یکی از رشته ها که آنتی سنس نام دارد، کمپلکس RISC را به سمت mRNA مکمل در داخل سلول راهنمایی می کند. پس از چسبیدن کمپلکس به mRNA هدف، اندونوکلاز موجود در آن mRNA را تجزیه می کند و باعث می گردد که به پروتئین مورد نظر ترجمه نگردد (۳، ۴، ۵، ۱۶). اثر خاموش سازی ژن به طور قابل توجه به انتقال مؤثر آن در سلول ها بستگی دارد. اندازه بزرگ siRNA (حدود ۱۳ کیلو دالتون) و بار منفی آن موجب می شود که از غشاء سلول به سختی عبور کند. از این رو برای انتقال آن در *in vivo* و *in vitro* از روش های متعددی از قبیل کونژوگاسیون آن با مشتقات کلسترول و پلی اتیلن گلیکول، استفاده از نانو ذرات و لیپوزوم کمک گرفته شده است. در ردیابی چنین مولکول هایی، از تکنیک های با اساس فلوروفور مثل بیولومینسانس و همچنین روش های با اساس رادیو اکتیو استفاده شده است. روش های اخیر ارجحیت دارند چون ردیابی با آن ها حساس تر و کمی است و چشم انداز استفاده در کلینیک را دارا هستند، در حالی که روش های فلوروفور به خاطر انرژی پایین حساسیت پایینی داشته و امکان استفاده در بدن انسان برای آن ها وجود ندارد (۱۷، ۱۰). مطالعات نشان داده است که در بیش از ۹۰٪ سلول های سرطانی کولون، رسپتور IGF-1R (رسپتور فاکتور رشد شبه انسولین نوع یک) افزایش بیان دارد. این افزایش مرتبط با حفظ فنوتیپ بدخیمی، ویژگی های ضد آپوپتوزی، تکثیر غیر قابل کنترل، متاستاز و آنژیوژنز در سرطان کولون است (۱۵، ۷). به ویژه، مطالعه قبلی ما نشان می دهد که خاموش سازی این رسپتور با RNAi، سلول های سرطانی کولون را به عوامل شیمی درمانی و پرتو درمانی حساس می کند. به علاوه این که تکثیر سلولی را کاهش و آپوپتوز را افزایش می دهد (۸، ۱۳). در پژوهش حاضر، RNA مداخله گر کوچک مولکول بر ضد IGF-1R با لوتسیم (137Lu) نشاندار گردید تا درصد ورود

منفی در آزمایش ها استفاده گردید. توالی سنس و آنتی سنس برای IGF-1R به ترتیب:

5'-UAGAUUUCUCGCGUCAUACdTdT-3'

5'-GUAUGACGCGAGAUUAUCUAdTdT-3'

و برای لوسیفراز به ترتیب:

5'-CACAAGUAGGAAGUUCGGAdTdT-3'

5'-UCCGAACUCCUACUUGUGdTdT-3'

می باشند. هر دو siRNA در بافر (1nmol/μl) siMAX جداگانه حل شدند و با p-SCN-Bn-DTPA حل شده در DMSO (2 mg/mL) مخلوط گردیدند به طوری که نسبت siRNA به شلاتور در محلول نهایی ۱ به ۵۰ بود. pH محلول نهایی با استفاده از بافر (0.2 M) NaHCO₃ به ۸/۵ رسانده شد تا واکنش آمینی بین آن ها شروع شود. در این شرایط siRNA ها به شلاتور متصل می گردند. مخلوط به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. برای توقف واکنش از بافر استات (0.1 M; pH 4.5) استفاده شد. تخلیص siRNA های کونژوگه از شلاتورهای آزاد، با ستون اولترافیلتراسیون Vivaspin صورت گرفت. به طور خلاصه، مخلوط در ستون ریخته شد و با آب مقطر حجم ستون تا ۲ mL پر شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ RPM سانتریفیوژ گردید. این عمل ۴ بار تکرار شد. با توجه به cut-off ستون (۳ کیلودالتون) و وزن مولکولی siRNA ها که حدود ۱۳/۵ کیلودالتون است، پس از سانتریفیوژ، مولکول های کوچک تر از ۳ کیلودالتون از ستون عبور می کنند و مولکول های siRNA در ستون باقی می ماندند. تولید لوتسیم رادیواکتیو (¹⁷⁶Lu) و نشاندار کردن siRNA های کونژوگه با شلاتور برای تولید ¹⁷⁶Lu، اکسید لوتسیم (¹⁷⁶Lu₂O₃) در اسید کلریدریک ۰/۲ مولار حل شد و در راکتور تحقیقاتی تهران به مدت ۱۴ روز پرتو دهی گردید. هر دو siRNA (ضد IGF-1R و ضد لوسیفراز) با یک روش یکسان نشاندار شدند. به طور خلاصه، ۲۵۰ μL بافر استات (0.1 M; pH 4.5) حاوی ۳ نانو مول siRNA های کونژوگه اضافه شد و پس از ۴۵ دقیقه اکوباسیون در دمای اتاق، با ستون سفادکس G25 تخلیص گردید. اساس این ستون، ژل فیلتراسیون است که در آن ابتدا مولکول های

بزرگ و سپس مولکول های کوچک خارج می گردند. ستون با PBS (pH 7.2) به تعادل رسانده شد و مخلوط حاوی siRNA و لوتسیم در آن قرار داده شدند. شستشوی ستون با PBS انجام و فرکشن های ۹ قطره ای جمع آوری گردید. رادیواکتیویته در فرکشن ها با یک کوریمتر (RAMS- Iran) و جذب فرکشن ها در OD₂₆₀ با بیوفتومتر (Ependorf) اندازه گیری شد. فرکشن هایی که OD₂₆₀ و رادیواکتیویته بالا داشتند (کمپلکس ¹⁷⁶Lu-siRNA) جمع آوری و آن هایی که فقط رادیواکتیویته داشتند (¹⁷⁶Lu آزاد) از آنالیز خارج شدند.

خلوص رادیو شیمیایی کمپلکس ¹⁷⁶Lu-siRNA

پس از تخلیص با ستون سفادکس G25، کمپلکس ¹⁷⁶Lu-siRNA با کروماتوگرافی لایه نازک (ITLC) برای تعیین در صد خلوص آنالیز گردید. محلول حاوی کمپلکس در ورق سیلیکا ژل (5 × 12 cm) لکه گذاری شد. آب- متانول (45:55 v/v) به عنوان حلال اجازه داده شد تا ۱۰ سانتی متر حرکت کند. در این شرایط، لوتسیم رادیواکتیو در محل لکه گذاری می ماند و کمپلکس ¹⁷⁶Lu-siRNA به همراه siRNA کونژوگه که نشاندار نشده است با Rf به ترتیب 0.8-0.9 و 0.5-0.6 همراه حلال حرکت می کنند. سیلیکا ژل به ۱۲ قطعه یک سانتی متری بریده و رادیواکتیویته قطعات به توسط شمارش گر گاما (ORTEC, Germany) محاسبه گردید. نسبت شمارش های ثبت شده در Rf=0.8-0.9 به کل شمارش به عنوان در صد خلوص رادیوشیمی کمپلکس در نظر گرفته شد.

بررسی کمپلکس ¹⁷⁶Lu-siRNA با ژل پلی آکریل آمید

غیر احیایی

با توجه به این که RNA ها در معرض تجزیه به توسط نوکلئازهای محیطی هستند و طی مراحل مختلف دست کاری مثل تخلیص، احتمال تجزیه آن ها وجود دارد؛ ژل پلی آکریل آمید (PAGE) استفاده گردید تا نشان داده شود که کمپلکس دست نخورده و تجزیه نشده است. ژل ۱۷٪ پلی آکریل آمید با بافر TBE (تریس- بوریک اسید- EDTA) درست شد و حدود یک میکروگرم از کمپلکس در چاهک ها قرار گرفتند. ژل به مدت پنج ساعت در ولتاژ ۸۰ انجام و باندها پس از رنگ آمیزی با سایبر گرین به وسیله UV.Doc آشکار گردیدند.

ساعت، محیط بدون آنتی بیوتیک آن ها عوض شد و با محیط کشت کامل جایگزین گردید. پس از سه روزا انکوباسیون در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO₂، چاهک ها با میکروسکوپ اینورت بررسی و میکروگراف تهیه شد و از هر چاهک شمارش سلولی انجام گرفت (تعداد آزمایش ها = ۵) که از میانگین آن ها برای آنالیز داده ها استفاده گردید.

آنالیز داده ها

از نرم افزار SPSS ویراست ۱۶ و روش Student's t-test و one way ANOVA برای آنالیز داده ها استفاده شد و داده ها به صورت میانگین با انحراف معیار مشخص (Mean ± SD) محاسبه گردید. مقادیر میانگین در گروه های مختلف با P Value مشخص، اختلاف معنی داری نشان می داد.

یافته ها

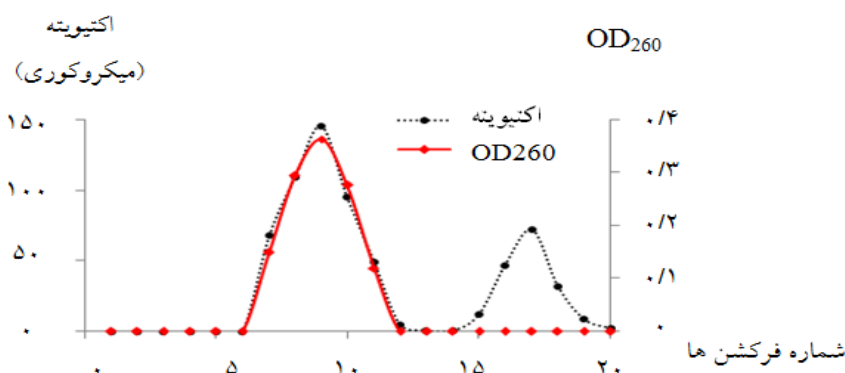
کروماتوگرافی لایه نازک (ITLC) نشان داد که تخلیص کمپلکس ¹²⁵I-siRNA با موفقیت انجام شده است. تخلیص کمپلکس ¹²⁵I-siRNA از ¹²⁵I آزاد با استفاده از ستون سفادکس G25 و محلول شستشوی PBS انجام شد. بر اساس اصول ژل فیلتراسیون، اول مولکول های بزرگ تر و سپس مولکول های کوچک تر از ستون خارج می گردند؛ بنابراین این می توان siRNA های نشاندار را که مولکول های بزرگ تری هستند از لوتسیم های اضافی در مخلوط جدا سازی نمود. همان طوری که شکل ۱ نشان می دهد، کمپلکس ¹²⁵I-siRNA در فرکشن های اول (۶-۱۲) و سپس لوتسیم آزاد در فرکشن های ۱۵-۲۰ خارج می گردد. جهت حصول اطمینان از تخلیص کمپلکس ¹²⁵I-siRNA، کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، اکتیویته در قطعات انتهایی (Rf = 0.8 - 0.9) که مربوط به کمپلکس ¹²⁵I-siRNA است از بقیه قطعات بیشتر است به طوری که در صد آن نسبت به کل، به بیش از ۹۵٪ می رسد که بیانگر تخلیص خوب کمپلکس می باشد.

بررسی در صد ورود کمپلکس ¹²⁵I-siRNA به سلول های سرطانی کولون

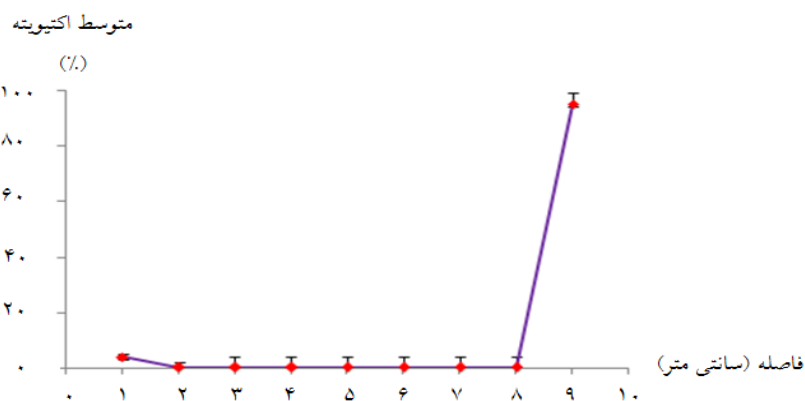
رده سلول سرطانی کولون (ATCC: CCL-22) SW480 در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) و جنتامایسین (۴۰ μg/mL) در انکوباتور ۵٪ CO₂ و ۳۷°C کشت داده شد. یک روز قبل از ترانسفکشن، سلول ها در فاز لگاریتمی رشد در پلیت شش خانه (۳×۱۰^۳ سلول در هر چاهک) در محیط بدون آنتی بیوتیک کشت داده شدند. برای ترانسفکشن، لیپوفکت آمین (Invitrogen, Cat. No. 11668-019) که یک لیپوزوم کاتیونی است و (siPORT Neo FX, Ambion, Cat. No. AM1631) که یک لیپوزوم معمولی است، استفاده گردید. ترانسفکشن با هر دو محلول طبق دستور شرکت سازنده با کمی تغییر انجام شد. در مورد لیپوفکت آمین، به ازاء هر چاهک پلیت شش خانه ۶ μL محلول ترانسفکشن با ۰/۵ نانو مول کمپلکس ¹²⁵I-siRNA در ۵۰۰ میکرو لیتر محیط کشت با سرم کم (۳/۰ در صد) مخلوط گردید و در مورد siPORT Neo FX، ۵ میکرو لیتر محلول با ۰/۵ نانومول کمپلکس در ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت با سرم کم مخلوط گردید. سلول ها در انکوباتور ۳۷°C در حضور محلول های ترانسفکشن انکوبه شدند. چاهک ها در زمان های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ ساعت پس از ترانسفکشن برداشت شدند. پس از برداشت محیط رویی، چاهک ها دو بار با PBS شستشو شدند و رادیواکتیویته مربوط به محیط رویی و PBS توسط شمارشگر گاما شمارش شد. پس از لیز سلولی به توسط هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار و ۱٪ SDS، دو بار با PBS شستشو شدند. تعداد شمارش های مربوط به محلول لیز به کل شمارش ها تقسیم شد و به عنوان در صد انتقال کمپلکس به سلول ها در نظر گرفته شد (تعداد آزمایش ها=۶). داده ها به صورت $SD \pm \text{mean}$ مورد بررسی قرار گرفتند.

اثر ¹²⁵I-siRNA روی رشد سلولی در سلول های سرطانی کولون

جهت شمارش سلولی، فلاسک های ۲۵ میلی لیتری با سلول ها کشت داده شدند و با غلظت ۲۰۰ نانو مولار کمپلکس ¹²⁵I-siRNA با لیپوفکت آمین ترانسفکت شدند. پس از ۱۲



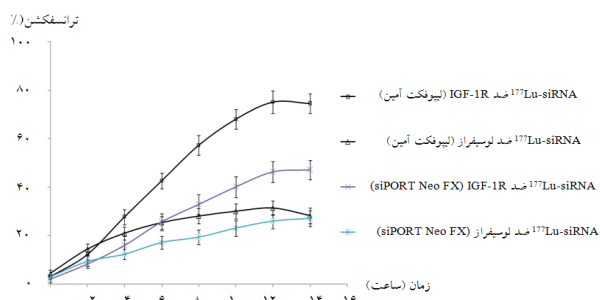
شکل ۱- تخلیص کمپلکس ^{125}I -siRNA: مخلوط حاوی siRNA و لوتسیم متصل به آن، در ستون سفادکس G25 قرار گرفت و با PBS شستشو داده شد. همان گونه که شکل نشان می دهد کمپلکس ^{125}I -siRNA که اندازه بزرگتری دارد در فرکشن های ۶-۱۲ خارج می گردد که دارای جذب و اکتیویته بالا می باشند. فرکشن های ۱۵-۲۰ که فقط اکتیویته بالا دارند مربوط به لوتسیم است که اندازه کوچک تری دارد و پس از کمپلکس خارج می گردد.



شکل ۲- در صد خلوص رادیو شیمیایی کمپلکس ^{125}I -siRNA: مخلوط تخلیص شده در ورق سیلیکاژل لکه گذاری گردید، همان طوری که در شکل مشخص است بیشترین اکتیویته در قطعات انتهایی ($R_f = 0/8 - 0/9$) که مربوط به کمپلکس ^{125}I -siRNA است تجمع می یابد.

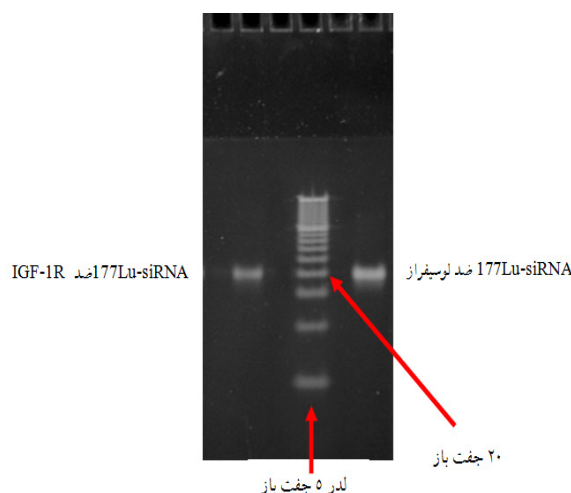
از انجام ژل، باند های رنگ آمیزی شده با سایبر گرین نشان داد که باند های siRNA بین ۲۰ و ۲۵ جفت باز قرار می گیرند که با وزن مولکولی آن یعنی حدود ۲۲ جفت باز مطابقت دارد. این اطلاعات در شکل ۳ نشان داده شده است.

ژل پلی آکریل آمید (PAGE) سالم بودن کمپلکس را تأیید کرد پس از تخلیص و قبل از ترانسفکشن، برای اینکه نشان داده شود siRNA نشاندار تجزیه نشده است، PAGE انجام شد. پس



شکل ۴- در صد ترانسفکشن کمپلکس های ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R و لوسیفراز به توسط لیپوفکتامین و siPORT Neo FX: کمپلکس های ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R و لوسیفراز جدا گانه ، با دو محلول ترانسفکشن لیپوفکتامین و siPORT Neo FX در پلیت های شش خانه ترانسفکت شدند. پس از ۱۲ ساعت، در صد ترانسفکشن به توسط لیپوفکتامین و siPORT Neo FX برای ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R به ترتیب $46/31 \pm 4/3$ و $75/08 \pm 4/7$ درصد و برای لوسیفراز به ترتیب $31/4 \pm 2/89$ و $26/12 \pm 3$ درصد می باشد. به لحاظ آماری اختلاف معنی داری در درصد ترانسفکشن کمپلکس ها به توسط لیپوفکتامین و ترانسفکشن آن ها با siPORT Neo FX وجود دارد ($P < 0.01$)، به طوری که درصد ترانسفکشن با لیپوفکتامین بیشتر است.

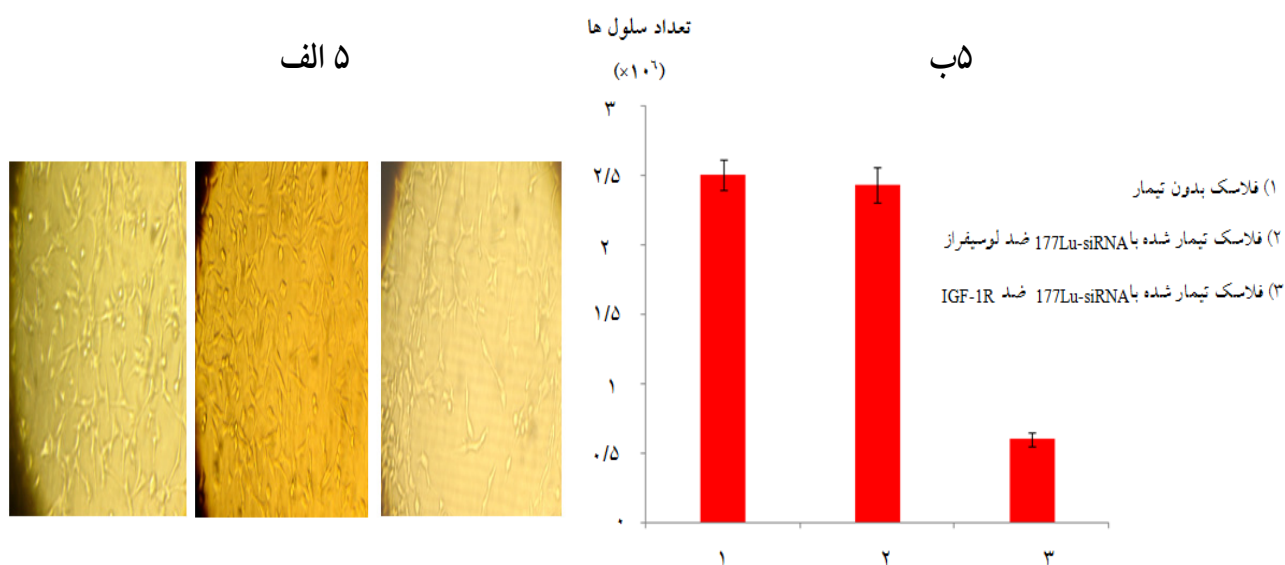
سه روز پس از تیمار با کمپلکس ^{177}Lu -siRNA، سلول های سرطانی توسط میکروسکوپ اینورت مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند، سپس تریپسینه و شمارش شدند. همان گونه که در شکل ۵ الف مشخص است، کمپلکس ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R اثر سیتوتوکسیک روی رده سلولی SW480 دارد و از تکثیر آن ها ممانعت می کند، در صورتی که تکثیر سلول ها در فلاسک های تیمار شده با کمپلکس کنترل (^{177}Lu -siRNA ضد لوسیفراز) مثل فلاسک های بدون تیمار صورت می گیرد. این مشاهدات با شمارش سلولی از فلاسک های مرتبط با تصاویر و آنالیز داده ها تأیید شدند. شکل ۵ ب نشان می دهد که متوسط تعداد سلول ها در پلیت تیمار شده با کمپلکس ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R در مقایسه با پلیت تیمار نشده و تیمار شده با ^{177}Lu -siRNA ضد لوسیفراز به طور معنی داری کاهش پیدا کرده است ($P < 0.001$).



شکل ۳- ژل غیر احیایی پلی اکریل آمید: کمپلکس های ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R و لوسیفراز به همراه لدر ۵ جفت باز در ژل ۱۷٪ آنالیز شدند. قرار گیری کمپلکس ها در حوالی ۲۰ جفت باز حاکی از آن است که کمپلکس ها تجزیه نشده اند.

لیپوفکت آمین در انتقال کمپلکس ^{177}Lu -siRNA به سلول های سرطانی کولون موثرتر عمل می کند.

بعد از محاسبه اکتیویته داخل و بیرون سلول ها، همان گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است؛ مشخص شد که تفاوت معنی داری در در صد انتقال کمپلکس ^{177}Lu -siRNA به سلول های سرطانی کولون توسط لیپوفکت آمین در مقایسه با siPORT Neo FX وجود دارد ($P < 0.01$). در صد انتقال کمپلکس ضد IGF-1R در هر دو مورد نسبت به کمپلکس ^{177}Lu -siRNA ضد لوسیفراز بیشتر است و این تفاوت ها از ۴-۱۲ ساعت پس از ترانسفکشن به لحاظ آماری معنی دار می باشد ($P < 0.01$). با توجه به این که حداکثر انتقال کمپلکس ها در ۱۲ ساعت پس از ترانسفکشن صورت می گیرد، در آزمایش های بعدی، حداکثر مجاورت سلول ها با کمپلکس ترانسفکشن ۱۲ ساعت انتخاب شد. در صد ترانسفکشن پس از ۱۲ ساعت، در سلول های ترانسفکت شده با ^{177}Lu -siRNA ضد IGF-1R با استفاده از لیپوفکتامین و siPORT Neo FX به ترتیب $46/31 \pm 4/3$ و $75/08 \pm 4/7$ درصد و برای ^{177}Lu -siRNA ضد لوسیفراز به ترتیب $31/4 \pm 2/89$ درصد و $26/12 \pm 3$ درصد بود.



شکل ۵. اثر سیتوتوکسیک siRNA های نشاندار با لوتسیم بر روی سلول های سرطانی کولون. الف) تصاویر میکروسکوپی: سلول های سرطانی کولون با غلظت ۲۰۰ نانومولار از کمپلکس های siRNA نشاندار با لوتسیم ترانسفکت شدند. سه روز پس از ترانسفکشن، سلول ها با میکروسکوپ اینورت تصویربرداری شدند. از چپ به راست به ترتیب سلول های بدون تیمار، سلول های تیمار شده با 177Lu-siRNA ضد لوسیفراز و تیمار شده با 177Lu-siRNA ضد IGF-1R نشان داده شده است. کاهش رشد سلولی در پلیت تیمار شده با 177Lu-siRNA ضد IGF-1R صورت می گیرد. ب) شمارش سلولی. پس از تصویربرداری، پلیت های تیمار شده و تیمار نشده تریپسین شدند و با لام نئوبار شمارش گردیدند (تعداد آزمایش ها = ۵). از متوسط تعداد سلول ها و انحراف معیار آن ها برای رسم شکل استفاده شد. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی داری در تعداد متوسط سلول ها در پلیت های تیمار شده با 177Lu-siRNA ضد IGF-1R در مقایسه با 177Lu-siRNA ضد لوسیفراز و پلیت تیمار نشده وجود دارد ($P < 0.001$).

بحث

Neo FX بیشتر بود که احتمالاً دلیل آن، حضور گروه های عاملی مثبت آمین در لیپوفکت آمین است که پیوندهای یونی تشکیل شده بین محلول ترانسفکشن و siRNA نقش مهمی در انتقال آن بازی می کند. انتقال کمپلکس 177Lu-siRNA ضد IGF-1R با هر دو محلول ترانسفکشن در مقایسه با کمپلکس کنترل یعنی لوسیفراز بیشتر بود که دلیل آن هم این است که کمپلکس 177Lu-siRNA ضد IGF-1R دارای mRNA هدف در سلول های سرطانی کولون برای اتصال به آن است در صورتی که ژن لوسیفراز در سلول ها سرطانی کولون حضور ندارد و به همین خاطر کمپلکس مربوطه تجمع پیدا نمی کند. در حال حاضر، مطالعه ای وجود ندارد که نشان دهد siRNA ضد IGF-1R نشاندار با لوتسیم از تکثیر سلول های سرطانی کولون ممانعت می کند، اگر چه آنتی بادی منوکلونال ضد Her-2/neu نشاندار با لوتسیم نشان داده است که از تکثیر سلول های سرطانی سینه جلوگیری می کند (۱۲). مطالعه ما نشان داد که اثر سیتوتوکسیک 177Lu-siRNA ضد IGF-1R روی

نیاز به روش های درمانی جدید برای سرطان کولون از آن جا ناشی می گردد که کارایی روش های درمانی متداول، پایین است (۴،۹). وقتی یک ایزوتوپ نشر کننده بتا و گاما به یک مولکول هدف دهنده مثل siRNA متصل می گردد، امکانی را فراهم می آورد که رد یابی مولکول هدف دهنده از طریق پرتو های گاما مقدور گردد علاوه بر آن، مولکول هدف دهنده به عنوان حامل برای ایزوتوپ عمل می کند و آن را به داخل سلول های سرطانی انتقال داده تا اثر سیتوتوکسیک پرتوهای بتا، روی سلول ها ظاهر شود (۷،۱۰). انتقال کمپلکس siRNA با تکنسیم (99mTc) به داخل سلول های سرطانی نشان داده که لیپوفکت آمین، ورود کمپلکس های نشاندار siRNA را به سلول های سرطانی تسهیل می کند (۵، ۶). مطابق آن، تحقیقات ما نشان داد که لیپوفکت آمین، انتقال کمپلکس 177Lu-siRNA را به داخل سلول های سرطانی کولون تسهیل می کند ضمن این که، اثر آن در انتقال کمپلکس به طور معنی داری از siPORT

سلول های سرطانی در مقایسه با گروه ^{125}I -siRNA ضد لوسیفراز و پلیت تیمار نشده بیشتر است. ظاهراً، علاوه بر این که siRNA به عنوان ناقل لوتسیم عمل می کند، با تجزیه mRNA هدف و کاهش بیان IGF-1R نقش مهمی در کاهش رشد سلول های سرطانی کولون دارد، چون مطالعات مکرر نشان داده که افزایش بیان آن در سلول های سرطانی کولون با تکثیر غیر قابل کنترل سلول ها ارتباط دارد (۱۳،۱۶). به طور کلی این تحقیق نشان می دهد که کارایی لیپوفکتامین در انتقال siRNA نشاندار با لوتسیم، بیشتر از siPORT Neo FX است و می توان از آن در انتقال siRNA نشاندار به سلول های سرطانی در *in vitro* استفاده کرد؛ همچنین کاهش رشد سلولی با ^{125}I -siRNA ضد IGF-1R که با شمارش سلولی تأیید شد بیان گر کارایی کمپلکس نشاندار در مهار رشد سلولی می باشد.

منابع

- (1) - Ansari R, Mahdavinia M, Sadjadi A, Nourai M, Kamangar F, Bishehsari F, Fakheri H, Semnani S, Arshi S, Zahedi MJ, Darvish-Moghadam S, Mansour-Ghanaei F, Mosavi A, Malekzadeh R. Incidence and Age Distribution of Colorectal Cancer in Iran: Results of a Population-Based Cancer Registry. *Cancer Lett*, 2006; 240(1): 143-7.
- (2)- Bartlett DW, Su H, Hildebrandt IJ, Weber WA, Davis ME. Impact of Tumor-Specific Targeting on The Biodistribution and Efficacy of siRNA Nanoparticles Measured by Multimodality in vivo Imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104(39): 15549-54.
- (3)- Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in Humans from Systemically Administered siRNA via Targeted Nanoparticles. *Nature*, 2010; 464(7291): 1067-70.
- (4)- Hickerson RP, Leachman SA, Pho LN, Gonzalez-Gonzalez E, Smith FJ, McLean WH, Contag CH, Leake D, Milstone LM, Kaspar RL. Development of Quantitative Molecular Clinical End Points for siRNA Clinical Trials. *J Invest Dermatol*, 2011; 131(5): 1029-36.
- (5)- Kang L, Wang RF, Yan P, Liu M, Zhang CL, Yu MM, Cui YG, Xu XJ. Noninvasive Visualization of RNA Delivery with ^{99m}Tc-Radiolabeled Small-Interference RNA in Tumor Xenografts. *J Nucl Med*, 2010; 51(6): 978-86.
- (6)- Lewington V. Development of 131I-tositumomab. *Semin Oncol*, 2005; 32: S50-6.
- (7)- Kaulfuss S, Burfeind P, Gaedcke J, Scharf JG. Dual Silencing of Insulin-Like Growth factor-I Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor in Colorectal Cancer Cells is Associated with Decreased Proliferation and Enhanced Apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 2009; 8(4): 821-33.
- (8)- Manson MM, Farmer PB, Gescher A, Steward WP. Innovative Agents in Cancer Prevention. *Recent Results Cancer Res*, 2005; 166: 257-75.
- (9)Merkel OM, Librizzi D, Pfestroff A, Schurrat T, Béhé M, Kissel T. In vivo SPECT and Real-Time Gamma Camera Imaging of Biodistribution and Pharmacokinetics of siRNA Delivery Using an Optimized Radiolabeling and Purification Procedure. *Bioconjug Chem*, 2009; 20(1): 174-82.
- (10)- Navarro G, Sawant RR, Biswas S, Essex S, Tros de Ilarduya C, Torchilin VP. P-Glycoprotein Silencing with siRNA Delivered by DOPE-modified PEI Overcomes Doxorubicin Resistance in Breast Cancer Cells. *Nanomedicine (Lond)*, 2012; 7(1): 65-78.
- (11)- Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Daha FJ, Salouti M. Radiolabeling of Trastuzumab with ¹⁷⁷Lu via DOTA, a New Radiopharmaceutical for Radioimmunotherapy of Breast Cancer. *Nucl Med Biol*, 2009; 36(4): 363-9.
- (12)- Yavari K, Taghikhani M, Ghannadi Maragheh M, Mesbah-Namin SA, Babaei MH. Downregulation of IGF-1R Expression by RNAi Inhibits Proliferation and Enhances Chemosensitization of Human Colon Cancer Cells. *Int J Colorectal Dis*, 2010; 25(1): 9-16.
- (13)- Yavari K, Taghikhani M, Maragheh MG, Mesbah-Namin SA, Babaei MH, Arfaee AJ, Madani H, Mirzaei HR. siRNA-Mediated IGF-1R Inhibition Sensitizes Human Colon Cancer SW480 Cells to Radiation. *Acta Oncol*, 2010; 49(1):70-5.
- (14)- Shan HB, Zhang R, Li Y, Xu GL, Luo GY, Gao XY, Yang HL. Expression of IGF-1R in Colorectal Polyps and its Role in Colorectal Carcinogenesis. *Technol Cancer Res Treat*, 2011; 10(4): 381-9.
- (15)- Sipa K, Sochacka E, Kazmierczak-Baranska J, Maszewska M, Janicka M, Nowak G, Nawrot B. Effect of Base Modifications on Structure, Thermodynamic Stability, and Gene Silencing Activity of Short Interfering RNA. *RNA*, 2007; 13(8): 1301-16.
- (16)- Shrey K, Suchit A, Nishant M, Vibha R. RNA Interference: Emerging Diagnostics and Therapeutics Tool. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009; 386(2): 273-7.

