اثر جایگزینی miRNA-34a در مهار رشد و مهاجرت سلولی و افزایش بیان ژنهای کاسپازی در رده سلولی HCT116 سرطان کلون

نازنین جعفرپور[۱]، حبیب عنصری[۲*] و بهزاد برادران[۳]

[۱] ایران، تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، گروه ژنتیک

[۲] ایران، مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

[۳] ایران، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ایمونولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

چکیده

سرطان کلون به عنوان شایع ترین سرطان دستگاه گوارش، چهارمین علت مرگ و میر در جهان است. بر اساس مطالعات انجام یافته، بیان miRNA-34a (miR-34a) در سرطان کولون کاهش می یابد. هدف این مطالعه، بررسی اثر جایگزینی miR-34a در مهار رشد و مهاجرت سلولی و القای آپوپتوز سلولهای سرطان کلون می باشد. در این مطالعه تجربی از سلولهای سرطانی HCT116 در محیط کشت RPMI1640 استفاده شد. انتقال miR-34a به داخل سلولهای سرطانی توسط ریجنت jetPEI صورت گرفت. تست MTT برای بررسی میزان زنده بودن سلولهای سرطانی و تست qRT-PCR برای تأیید انتقال miR-34a به داخل سلولها و نیز بررسی بیان ژنهای کاسپازی استفاده شد. در نهایت، تست Wound healing به‌منظور بررسی وضعیت مهاجرت سلولهای ترانسفکت شده و سلولهای کنترل انجام یافت. میزان تغییرات بیان ژنهای مورد نظر در سلولهای ترانسفکت شده نسبت به سلولهای کنترل با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بررسی شد. تست MTT نشان داد که القای miR-34a به‌صورت وابسته به دُز باعث مرگ سلولهای سرطان کلورکتال می شود. همچنین نتایج حاصل از تست qRT-PCR افزایش قابل‌توجه miR-34a را در سلولهای HCT116 ترانسفکت شده نسبت به سلولهای کنترل و همچنین افزایش بیان ژنهای کاسپاز ۳، ۸ و ۹ را در سلولهای ترانسفکت شده نشان داد. در نهایت نتایج تست Wound healing کاهش مهاجرت سلولهای ترانسفکت شده را در مقایسه با سلولهای کنترل نشان داد. این مطالعه نشان داد که miRNA-34a نقش مهمی در مهار رشد و مهاجرت سلولهای سرطان کولون دارد و می تواند کاندیدای مناسبی برای درمانهای مولکولی باشد.

واژه‌های کلیدی: miRNA-34a، سرطان کولون، HCT 116، مهاجرت سلولی، کاسپاز

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۴۴۹۱۶۳۳۷ ، پست الکترونیکی: onsoribiomol@marandiau.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از عوامل مرگ‌ومیر در جهان پس از بیماریهای قلبی و عروقی می‌باشد(۱). سرطان دومین علت مرگ در کشورهای توسعه‌یافته و سومین علت مرگ در کشورهای کمتر توسعه‌یافته بوده (۲۰) و در ایران پس از بیماریهای قلبی–عروقی و سوانح، سومین علت مرگ به شمار می‌آید (۳۰). سرطان کلورکتال سومین بدخیمی شایع در سطح جهان و دومین علت مرگ ناشی از سرطان‌ها در ایالت متحده آمریکا است (۲۱و۳۶). به دلیل افزایش غربالگری و پیشرفت روشهای درمان، میزان مرگ و میر سرطان کلورکتال در سالهای ۱۹۷۰ تا ۲۰۱۵ در میان مردان و زنان ۵۲ درصد کاهش یافته است. با این حال، بین سالهای ۲۰۰۶ و ۲۰۱۵، میزان مرگ و میر در میان

بزرگسالان جوانتر از ۵۵ سال به میزان ۱ درصد افزایش را نشان می دهد (۵). در حال حاضر یکی از شایع‌ترین سرطانهای دستگاه گوارش در ایران سرطان کلورکتال است که از نظر بروز در مردان ایرانی رتبه سوم و در زنان ایرانی رتبه چهارم را به خود اختصاص داده است (۱۲). ژنتیک سرطان کلورکتال دو نوع ارثی و تک‌گیر می‌باشد که تقریباً ۸۰ درصد موارد آن تک‌گیر و ۲۰ درصد موارد دیگر وراثتی می‌باشند (۴و۱۵). مطالعات نشان داده اند که تغییر در ژنهای ترمیم کننده DNA (مثل *MSH2*، *MSHG*، *PMS2*، *PMS* و *MLH1*)، ژنهای مسیر های سیگنالینگ (مثل *CTNNB1*، *AXIN*، *SFRP* ، *LRP* و *BTRCP*)، پروتوانکوژنها (مثل *K-RAS*)، ژنهای مهار کننده تومور (مثل *P53*)، ژنهای درگیر در آپوپتوز (مثل *Caspase-9*، *Caspase-8* و *Caspase-3*) در پیشرفت سرطان کلون نقش دارند. در حالت طبیعی، بیان همه این ژنها با مکانیسمهای مختلف تحت کنترل و تنظیم می باشند که از جمله آنها می توان به میکرو RNA ها (miRNAs) اشاره کرد (۱۶).

miRNA ها زیرگروه بزرگی از RNA ها می‌باشند که از نظر تکاملی حفاظت شده هستند. بیوژنز miRNA ها در هسته اتفاق می افتد و به دنبال آن در سیتوپلاسم به همراه یک سری پروتیینها تشکیل یک مجموعه ریبونوکلوپروتیینی به نام RISC (RNA-induced silencing complex) می دهند. miRNA ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA ها یا القای تجزیه آنها کنترل کرده و این کار را از طریق اتصال به ناحیه 3′-UTR در mRNA انجام می‌دهند. miRNA ها را ازنظر عملکردی در سلول‌ها به دو دسته مهار کننده تومور و انکوژن تقسیم می‌کنند (۱۴، ۲۷، ۲۹ و ۴۰). حدود ۵۳۰۰ مولکول miRNA انسانی شناسایی شده است و از این‌رو miRNA ها به‌عنوان فراوان‌ترین ژن‌های نظارتی در انسان می‌باشند (۳۷). با کشف miRNA ها در پستانداران و مطالعاتی که در مورد نقش این مولکولها در سرطان انجام‌گرفته است دو واقعیت مهم به اثبات رسیده است; اول اینکه miRNA ها در سرطان بیان متفاوتی دارند و دوم اینکه تغییر بیان miRNA ها در هر نوع تومور علائم منحصربه‌فردی را ایجاد می‌کند (۱۹، ۲۲، ۲۳ و ۴۴). افزایش بیان miRNA های انکوژن در سلولهای توموری مشخص‌شده است(۹ و۱۱). در مقابل، miRNA های مهارکننده تومور در سلولهای توموری کاهش بیان را نشان می دهند (۳۲و۳۳). علت تنظیم نادرست miRNA ها در بافت‌های توموری می‌تواند درنتیجه جهش، تغییرات اپی ژنتیک، حذف ژنی و یا تغییر در پردازش miRNA باشد. بیان نادرست miRNA به‌صورت اولیه و یا سرکوب یک miRNA می‌تواند به‌صورت مؤثر در تومور زایی و یا پیشرفت تومور نقش داشته باشد (۷، ۸ و ۱۷). مهاجرت سلولی و تهاجم از ویژگیهای اصلی سلولهای تومور متاستاتیک است که مسئول مرگ ناشی از سرطان هستند. به‌خوبی شناخته‌شده است که پتانسیل یک سلول تومور برای متاستاز بستگی به عوامل متعددی دارد. شواهد نشان می‌دهد که miRNA ها می‌توانند نقش مهمی در تنظیم حمله سلولهای تومور و متاستاز داشته باشند (۳۱).

نقش miRNA ها در تنظیم مسیر سرطانی شدن باعث می‌شود که آنها اهداف مناسبی برای درمان سرطان باشند و افزایش یا کاهش فراوانی miRNA های اختصاصی به‌صورت مصنوعی ممکن است وسیله‌ای برای اصلاح بیولوژی تومور و درنتیجه تغییر پیامدهای بالینی باشد (۴۱). چند استراتژی برای دست‌کاری miRNA ها در داخل بدن تحت بررسی می‌باشد که یکی از این روشها جایگزینی miRNA در سلولهای سرطانی می‌باشد. شواهدی مبنی بر اینکه تنظیم پروتئینهای درگیر در مسیر مهم پاتوژنز سرطان کولون نیز توسط miRNA ها تنظیم می‌شود، وجود دارد (۴۳). miRNA های متعددی با ویژگیهای ضد توموری در سرطان کولون معرفی و مطالعه شده‌اند که از جمله می‌توان به miR-34a اشاره کرد (۳۱). ژن کد کننده miRNA-34a روی کروموزوم شماره ۱ در موقعیت 1p36.22 واقع شده است که ناحیه شکننده در ژنوم می‌باشد. miR-34a به عنوان تنظیم کننده مهار تومور شناخته شده و در بیشتر سرطانها

ازجمله سرطان سینه، ریه و کولون کاهش بیان miR-34a گزارش شده است. در بیشتر شرایط، بیان زیاد miR-34a باعث مهار تکثیر سلولی و یا القای پیری زودرس سلولی می شود، در حالی که القای آپوپتوز بعد از افزایش بیان miR-34a در برخی مدلهای آزمایشگاهی دیده شده است(۳۸).

آپوپتوز مرگ برنامه ریزی شده سلول است که جزء اصلی آن، یک سیستم لیز کننده پروتئین به نام کاسپاز می باشد. کاسپاز ها به دو دسته تقسیم می شوند: کاسپازهای آغازگر مثل کاسپازهای ۸، ۹ و ۱۲ که نقش اصلی آنها فعال کردن کاسپازهای پایین دست بوده و کاسپازهای اجرایی مثل کاسپازهای ۳، ۶ و۷ که مسئول تخریب پروتئینهای سلولی هستند. فعال شدن کاسپازها در فرایند آپوپتوز طی چهار مسیر می باشد که مسیر میتوکندریایی (مسیر داخلی) و مسیر وابسته به گیرنده های مرگ (مسیر خارجی) از اهمیت زیادی برخوردار هستند. در مسیر داخلی، کاسپاز ۹ به عنوان کاسپاز آغازگر و کاسپاز ۳، مهمترین کاسپاز اجرایی می باشد و در مسیر خارجی، کاسپاز ۸ به عنوان کاسپاز آغازگر می باشد(۴۲).

امروزه miRNAها و از جمله miR-34a به جهت توانایی در تنظیم بیان چندین ژن هدف درگیر در تومورزایی و گسترش تومور مانند *MYC*، *CDK4/6*، *BCL2*، *NOTCH1*، *MET* و تعداد زیادی از مولکولهای درگیر در سرطان مورد توجه قرار گرفته است(۲). با توجه به اینکه از یک طرف کاهش بیان miR-34a در سرطان کولون باعث افزایش تکثیر و متاستاز سلولی می‌شود و از طرف دیگر مطالعات کمی در ارتباط با اثر miR-34a بر فرایند آپوپتوزیس سلولی وجود دارد، لذا هدف این تحقیق جایگزینی miR-34a در سلولهای سرطان کلون رده HCT116 و بررسی اثر این miRNA بر میزان رشد، مهاجرت و آپوپتوز این رده سلولی می باشد.

مواد و روشها

کشت سلولی: در این مطالعه تجربی که در مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام یافت، سلولهای سرطانی HCT116 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI1640 (Lot NO.1775866X,Gibco) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Lot NO.42Q7363,Gibco) استریل شده به‌وسیله فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی، ۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی سیلین 100 IU/mL، استرپتومایسین 100µL /mL) ، ۲ میلی مولار گلوتامین و ۱ درصد سدیم پیروات کشت داده شده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی اکسید کربن در فلاسکهای ۲۵ mL کشت داده شد. تعویض محیط کشت هر ۳ روز یک بار انجام گرفت. پس از گذشت مدت زمان لازم و رسیدن سلولها به تراکم ۷۰ الی ۸۰ درصد، سلولها جهت انجام تستهای مختلف مورد استفاده واقع شدند.

تست MTT : در این آزمایش از نمک زرد رنگ تترازولیوم استفاده می گردد، به طوری‌که ابتدا تعداد ۱۵۰۰۰ سلول HCT116 همراه با محیط کشت RPMI1640 و FBS ۱۰ درصد در هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی توزیع و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، سلولها با دوز های ۲/۵ ، ۵ و ۷/۵ نانومول از miR-34a تیمار شدند. برای افزایش دقت در آزمایشات، افزودن هر دُز از miR-34a به صورت سه تایی صورت گرفت و سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد محیط رویی به آرامی جمع آوری و دور ریخته شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ µL از PBS (شرکت Gibco، Lot No.2259817 ، آمریکا) جهت شستشو اضافه گردید و سپس PBS دور ریخته شد. پس از مرحله شستشو، مقدار ۵۰ µL از محلول MTT (شرکت BioBasic، Lot No.DU21373R2 ،

کانادا) همراه با ۱۰۰ µL از محیط کشت کامل RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد FBS به هر چاهک افزوده و ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد و پس از سپری شدن زمان انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، محلول رویی را به‌آرامی خارج کرده و سپس ۲۰۰ µL از دی متیل سولفوکسید (DMSO) (شرکت Lot No.85011641, Applichem کشور آلمان) به همراه ۲۵ µL از بافر سورنسون به هر چاهک افزوده شد و این بار به مدت ۳۰ دقیقه پلیت را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نموده و پس از ۳۰ دقیقه، پلیت در دستگاه ELISA Reader قرار داده شد و تغییر رنگ چاهکها با طول‌موج ۶۳۰ و ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد.

جایگزینی miR-34a : انتقال miR-34a (origene,USA,sku:sc400344) به داخل سلولها با توجه به دستورالعمل سازنده با استفاده از jetPEI reagent (Polyplus, France) انجام شدکه یک reagent ترانسفکت کننده قوی DNA و siRNA است که موجب کارایی بالا در انتقال DNA می شود. تعداد تقریبی 10^6 سلول در محیط کشت RPMI1640 در پلیتهای ۶ تایی کشت و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

با توجه به پروتکل ترانسفکشن، در ۶ میکروتیوب به‌صورت جداگانه مقدار ۳۰µL محیط کشت ترانسفکشن ریخته شد، میکروتیوبها به دو گروه A و B تقسیم شدند و در گروه A به ترتیب مقادیر ۲/۵ ، ۵ و ۷/۵ نانومول از miR-34a ریخته و در گروه B در هر سه میکروتیوب ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر jetPEI ریخته شد، سپس محتویات میکروتیوبهای A به ترتیب به گروه B انتقال داده شد و بعد از اسپین کردن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در زیر هود لامینار انکوبه گردید. محیط رویی پلیت را خالی کرده و سه دز موجود به‌صورت Triplicate به چاهکهای انتخابی انتقال و در انکوباتور قرار داده شد و بعد از ۶ ساعت محیط RPMI1640 حاوی FBS ۲۰ درصد را به چاهکها اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرارداده شد.

استخراج RNA و تهیه cDNA : ابتدا از سلولهای کنترل و ترانسفکت شده رسوب سلولی تهیه شد و استخراج RNA با استفاده از محلول ترایزول با نام تجاری RiboEx(شرکتGene All، Lot NO.REX15J12014 کره) انجام گرفت. غلظت RNA استخراج‌شده به‌وسیله دستگاهNano Drop 2000c (شرکتThermo آمریکا) اندازه‌گیری شد و سنتز cDNA بر اساس کیت EXIQON (شرکت EXIQON دانمارک) انجام یافت.

Quantitative real time PCR (qRT-PCR) : بعد از سنتز cDNA، طبق پروتکل غلظت آنها به صورت ۱ به ۸۰ رقیق‌سازی شدند. میزان miR-34a داخل سلولی به‌وسیله qRT-PCR اندازه‌گیری شد. برای تهیه مخلوط واکنش مقدار ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۵ میکرولیتر Master شامل dNTPs و SYBRGreen (شرکت EXIQON دانمارک) و ۱ میکرولیتر پرایمر primer mix has-miRNA-34a (شرکت EXIQON دانمارک) به میکروتیوبهای مخصوص qRT-PCR انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه Light cycle 96 (شرکت Roche با REF:05815916001J و با SN:11769، آلمان) انتقال داده شد و برنامه‌ی آن طبق پروتکل به‌صورت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه و دو مرحله به‌صورت ۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه و ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه طی 45 cycle در ۱/۶ ثانیه Ramp و در پایان سیکل مرحله Melting تنظیم گردید. در این روش کمی، میزان بیان نسخه‌های miR-34a بر میزان فلورسانت تولیدشده در طول تکثیر cDNA اندازه‌گیری می‌شود. در این تحقیق، بر اساس کیت (Exiqon, Denmark) از *Snord48* به عنوان کنترل داخلی برای miRNA استفاده شد.

ژنهای مورد بررسی در این آزمایش در ارتباط با آپوپتوزیس سلولی عبارت از *Caspase-3*، *Caspase-8* و *Caspase-9* به همراه ژن *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی بودند. cDNA این ژنها با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo,scientific,Rock ford,IL,USA) سنتز شد. میزان بیان این ژنها با استفاده از کیت SYBR Green PCR Master mix (Ampliqon, Denmark) و سیستم light cycler 96 (Roche,Germany) سنجیده شد. از ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد .مجموعه پرایمر های مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار آنلاین طراحی پرایمر(http://www.NCBI.gov) طراحی شدند (جدول۱).

Wound Healing Assay : در این تست، سلولها به تعداد 5×10^5 عدد در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون و چسبیدن سلولها به کف پلیت و پر کردن کامل کف آن، با نوک سر سمپلر استریل، شیاری در محیط کشت ایجاد کرده و چاهکها یک‌بار با بافر PBS شستشو داده شد و بعد محیط کشت غنی با 10%FBS به این پلیتها اضافه شد. سپس توسط میکروسکوپ معکوس (Optika,XD5-3, Italy) از چاهک در ساعت صفر (شروع تست) عکس‌برداری شد، بعد از گذشت مدت زمانهای ۴۸ ساعته و ۷۲ ساعته، مهاجرت سلولها از لبه شکاف به محل شکاف در نمونه‌های ترانسفکت شده و نمونه کنترل مقایسه و عکس‌برداری شد.

جدول ۱- اسامی ژن ها و توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

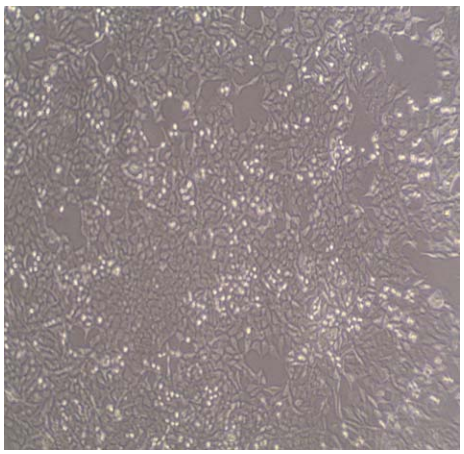
Gene	*Forward primer*	*Reverse primer*
hsa-miR-34a	5′-tggcagtgtcttagctggttgt-3′	5′-caatcagcaagtatactgccct-3′
Snord48	5′-tgatgatgaccccaggtaactct-3′	5′-gcgagcacagaattaatacgac-3′
Caspase-3	5′-ctcggtctggtacagatgtcga-3′	5′-catggctcagaagcacacaaac-3′
Caspase-8	5′-ggtcacttgaaccttgggaa-3′	5′-aggccagatcttcactgtcc-3′
Caspase-9	5′-gtggacattggttctggaggat-3′	5′-cgcaacttctcacagtcgatg-3′
Gapdh	5'-gggtgtgaaccacgagaaat-3'	5'-actgtggtcatgagcccttc-3'

آنالیز آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده از آزمایشات ذکر شده، از نرم افزار Graph Pad Prism6 استفاده گردید. برای تعیین تغییرات بیان ژن بین سلولهای کنترل و ترانسفکت شده با miR-34a، (آنالیز واریانس یکطرفه) t test، One-way ANOVA و Two-way ANOVA انجام پذیرفت. سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

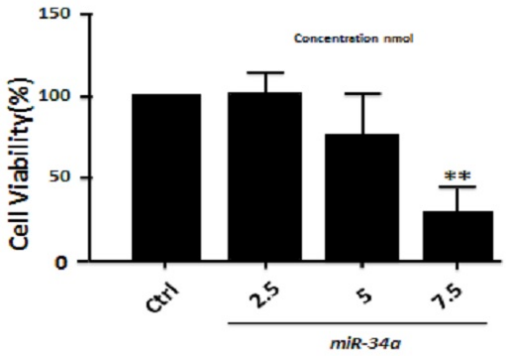
کشت سلولی: پس از دفریز کردن رده سلولی HCT116 و انتقال به محیط کشت درون فلاسک و چندین سری پاساژ دادن، سلولها در فازلگاریتمی مورد استفاده قرارگرفتند (شکل۱).

کاهش درصد سلولهای زنده در اثر جایگزینی miR-34a : به منظور بررسی میزان زنده ماندن سلولها، تست MTT انجام گرفت که این میزان در دُز های ۲/۵ ، ۵ و ۷/۵ نانومول اندازه گیری شد. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است درصد زیستایی سلولهای HCT116 با افزایش غلظت miR-34a کاهش می یابد.



شکل۱- سلولهای HCT116 در محیط کشت RPMI1640 با بزرگ‌نمایی x۴۰

افزایش بیان miR-34a در سلولهای HCT116 ترانسفکت شده: پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، تأثیر جایگزینی miR-34a در رده سلولی HCT116 و میزان بیان miR-34a در گروه کنترل و گروه سلولهای ترانسفکت شده توسط qRT-PCR ارزیابی گردید.

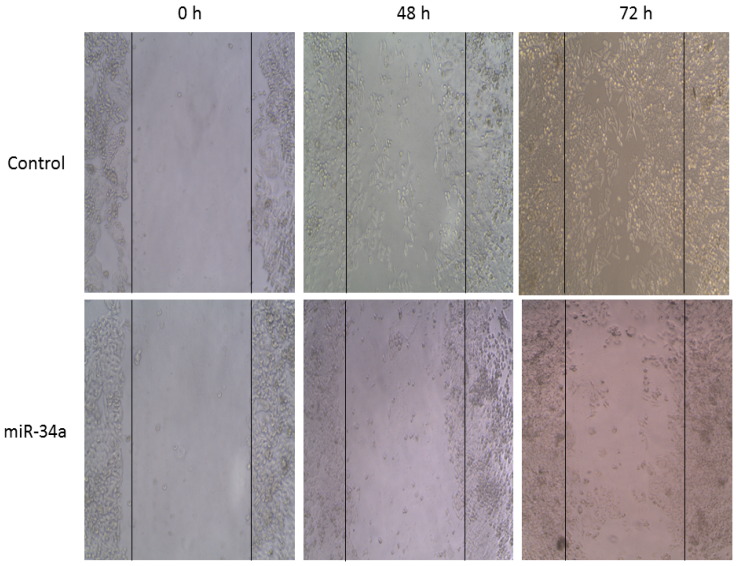


نمودار۱- درصد زنده ماندن سلولهای HCT116 در دوز های مختلف miR-34a . آنالیز داده های حاصل از تست MTT نشان می‌دهد که بقای سلولهای HCT116 ترانسفکت شده با miR-34a در مقایسه با گروه کنترل به صورت وابسته به دُز کاهش می یابد ($p<0.05$**).

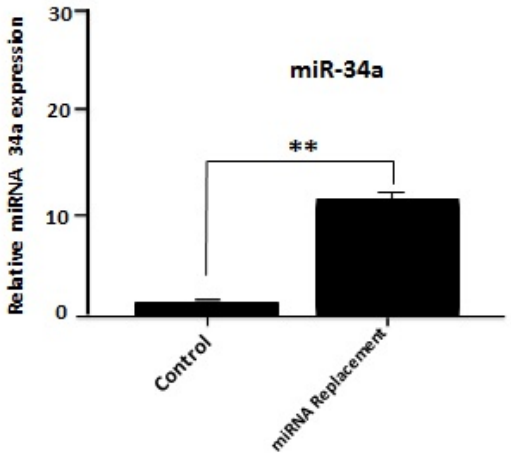
آنالیز داده های به‌دست‌آمده نشان داد که میزان miR-34a در سلولهای HCT116 پس از جایگزینی به طور معنی داری ($p<0.01$) نسبت به گروه کنترل افزایش می یابد (نمودار۲). میزان بیان miR-34a نسبت به بیان ژن *Snord48* به عنوان کنترل داخلی سنجیده شد.

کاهش مهاجرت سلولی با جایگزینی miR-34a در سلولهای HCT116 : برای ارزیابی اثر افزایشی miR-34a در مهار مهاجرت سلولهای HCT116، تست Wound healing انجام یافت. نتیجه این تست به‌صورت مجموعه‌ای از عکسها گردآوری‌شد. تعداد سلولهای مهاجر در گروه سلولهای ترانسفکت شده و کنترل در زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش و آنالیز داده های حاصل با آزمون آماری Two-way ANOVA صورت گرفت. نتایج نشان‌دهنده کاهش مهاجرت سلولها پس از جایگزینی miRNA-34a می‌باشد (شکل ۲ و نمودار۳).

تغییرات بیان ژنهای کاسپازی: آنالیز داده های حاصل از منحنیهای تکثیر به روش qRT-PCR نشان داد که بیان ژنهای کاسپازی مورد مطالعه در این تحقیق در اثر جایگزینی miR-34a در سلولهای HCT116 ترانسفکت شده نسبت گروه کنترل به طور معنی داری ($p<0.05$) افزایش یافته است (نمودارهای ۴، ۵ و ۶).



شکل۲- تغییر در مهاجرت سلولهای HCT116 ترانسفکت شده با miR-34a. تست Wound healing نشان می دهد که میزان مهاجرت سلولهای ترانسفکت شده با miR-34a در مقایسه با سلولهای کنترل در زمان های ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش یافته است.

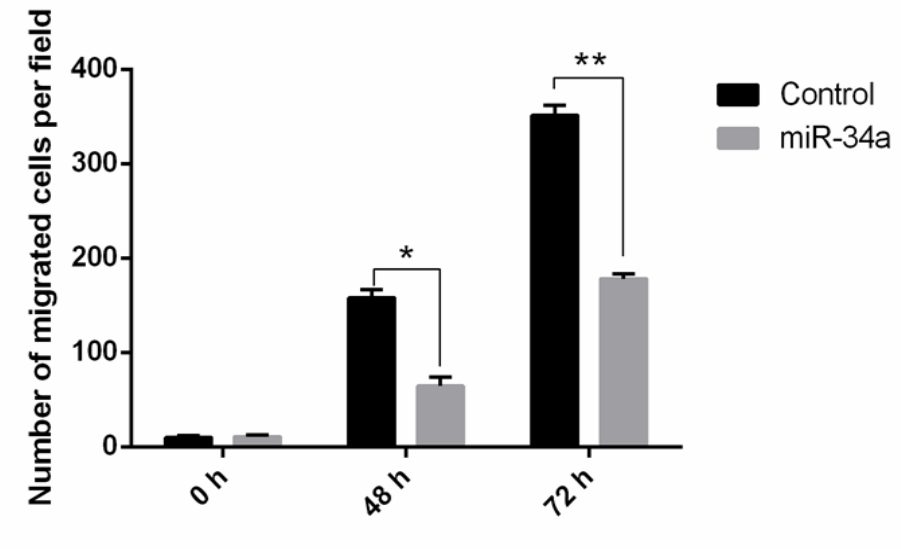


نمودار ۲- تغییرات بیان miRNA-34a در سلولهای HCT116 ترانسفکت شده. میزان بیان miR-34a در سلولهای ترانسفکت شده در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار افزایش یافته است (** $P<0.01$).

میزان بیان ژنهای کاسپازی نسبت به بیان ژن *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی سنجیده شد.

بحث و نتیجه گیری

سرطان کلورکتال یکی از شایع ترین سرطانها است به طوری که در کشورهای توسعه یافته به عنوان سومین عامل مرگ در مردان و دومین عامل مرگ در زنان به شمار می‌رود (۳۵). شیوع آن در مناطق مختلف جغرافیایی بسیار متفاوت می‌باشد و ارتباط نزدیکی با سبک زندگی افراد دارد. علی‌رغم نقش بالای وراثت، اکثر موارد سرطان کلورکتال تک‌گیر بوده و در طی چندین سال به‌آرامی پیشرفت می‌کند.

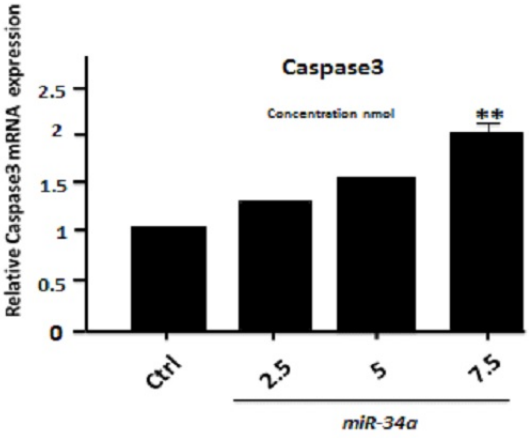


نمودار ۳- میزان مهاجرت سلولهای HCT116. آنالیز داده های حاصل از تست Wound healing نشان می دهد که میزان مهاجرت سلولهای HCT116 ترانسفکت شده با miR-34a کمتر از سلولهای کنترل در زمان‌های۴۸و ۷۲ ساعت می‌باشد.

مشخص‌شده که غربالگری می‌تواند میزان بروز و مرگ‌ومیر ناشی از این سرطان را به‌طور قابل‌توجهی کاهش دهد، اما در حال حاضر برنامه‌های غربالگری سازماندهی‌شده‌ای در اکثر کشورها تحقق نیافته است(۶)؛ بنابراین اهمیت انجام بسیاری از کارهای تحقیقاتی در این زمینه مشخص می‌شود.

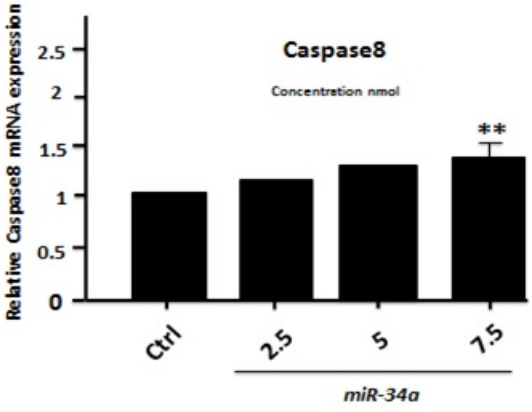
miRNA های مهارکننده تومور‌ی در سرطان کولون همانند سایر سرطانها شامل miRNA هایی می‌باشند که میزان بیان آنها رابطه معکوس با سرعت و شدت سرطان دارند. دستیابی به روشهای کارآمد برای بازگرداندن بیان این

miRNA های مهارکننده تومور برای درمان و کنترل خود سرطان و یا عوارض ناشی از این بیماری بسیار مورد توجه می‌باشد(۲۶و۴۲). راهکارهای مؤثر جهت مهار و کنترل پیشرفت متاستاز نیاز به درک مکانیسم مولکولی متاستاز و مولکولهای تنظیم‌کننده‌ای که فرایند متاستاز را در مراحل مختلف تنظیم می‌کنند، دارد(۳۹).



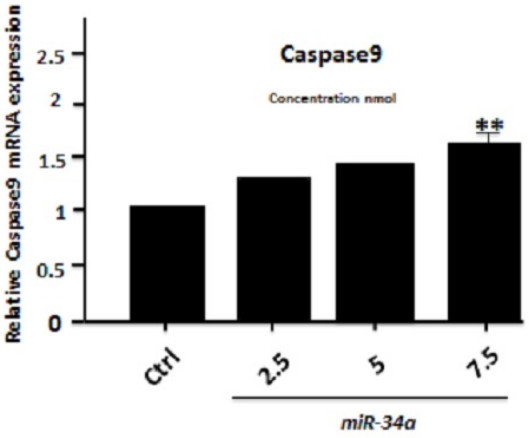
نمودار ۴- تغییرات بیان ژن *Caspase-3* در سلولهای HCT116 پس از جایگزینی miR-34a.

جایگزینی miR-34a در سلولهای HCT116 باعث افزایش معنی دار بیان ژن *Caspase-3* نسبت به گروه کنترل می شود (P<0.05 **).



نمودار ۵- تغییرات بیان ژن *Caspase-8* در سلولهای HCT116 پس از جایگزینی miR-34a.

جایگزینی miR-34a در سلولهای HCT116 باعث افزایش معنی دار بیان ژن *Caspase-8* نسبت به گروه کنترل می شود (P<0.05 **).



نمودار ۶- تغییرات بیان ژن *Caspase-9* در سلولهای HCT116 پس از جایگزینی miR-34a.

جایگزینی miR-34a در سلولهای HCT116 باعث افزایش معنی دار بیان ژن *Caspase-9* نسبت به گروه کنترل می شود (P<0.05 **).

کشف miRNA ها به‌عنوان تنظیم‌کنندگان اصلی بیان ژن، امیدهای تازه و مؤثری را در بحث مهار رشد و مهاجرت در سرطان به وجود آورده است. یکی از miRNA های مورد توجه که گزارشهای متعددی از کاهش بیان آن در سرطانهای مختلف، ازجمله سرطان سینه، ریه، کولون در دسترس می‌باشد، miRNA-34a می‌باشد(۱۸). ازآنجاکه کاهش بیان miR-34a در سرطان کولون باعث افزایش تکثیر و متاستاز و کاهش آپوپتوز می‌شود، می‌توان این miRNA را به‌عنوان یک هدف درمانی برای سرطان کولون مطرح نمود و در اینجا روش جدیدی به نام miRNA Replacement therapy مطرح می‌شود که در این روش با جایگزینی miRNA در سلولهای سرطانی از طریق ترانسفکت miRNA موردنظر، می‌توان بیان miRNA را در سلولهای سرطانی به سطح طبیعی بازگرداند و miRNA موردنظر بیان ژنهای هدف خود را به‌صورت طبیعی تنظیم نماید. از مزایای این روش می‌توان به پایداری مهار کننده های تومور، طبیعی بودن آنها در بافتهای طبیعی بدن، کنترل مسیرهای ایجاد سرطان و تعداد زیادی انکوژن اشاره کرد و همچنین به علت وجود تعداد فراوان این مولکول در سلولهای نرمال

عوارض جانبی کاهش یافته و از طرفی باعث افزایش حساسیت سلولهای توموری می‌گردد (۱۸و۴۵).

در این مطالعه نتیجه اولیه جایگزینی miR-34a که با دستگاه Real Time PCR نشان داده شد، حاکی از موفقیت‌آمیز بودن روش انتقال miR-34a به درون سلول با استفاده از پروتکل jetPEI بود. نتایج تست MTT نشان داد که القای miR-34a به‌صورت وابسته به دُز باعث مرگ سلولهای کلورکتال می شود. نتایج به‌دست‌آمده از qRT-PCR افزایش معنی‌دار miR-34a پس از جایگزینی در سلولهای HCT116 در مقایسه با گروه کنترل، بیانگر صحیح بودن ترانسفکت و داشتن عملکرد قابل‌قبول جهت افزایش مهارکننده تومور miR-34a می‌باشد. درنهایت نتایج تست Wound healing کاهش مهاجرت سلولهای ترانسفکت شده را در مقایسه با سلولهای کنترل نشان داد. نتایج پیش رو همسو با نتایج مطالعه دنگ و همکارانش (۲۰۱۸) بود که نشان داد هدف قرار دادن miR-34a در بافت سلولی سرطان معده موجب افزایش بیان قابل‌توجه این ژن در رده سلول سرطان معده، SGC-7901 گردید(۱۰). مطالعه‌ای که بینما و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام دادند نشان داد که miR-34a در فرآیند تشکیل سلولهای توموری سرطان کلورکتال نقش دارد(۲۵). مطالعه تنگلو و همکارانش در سال ۲۰۱۸، نشان‌دهنده کاهش تکثیر و مقاومت دارویی در سرطان تخمدان با جایگزینی miR-34a بود (۲۴). درواقع، جایگزینی miRNA های سرکوب‌کننده تومور، یک استراتژی مؤثر علیه ناهمگنی تومور و سیستمهای تحویل انتخابی مبتنی بر RNA را فراهم می‌کند و به نظر می‌رسد یک روش عالی و مؤثر برای هدف قرار دادن تومور است(۲۸). همچنین ژنگ و همکارانش (۲۰۱۷) در مطالعه ای بر روی سرطان کلون، نشان دادند که miR-34a با هدف قرار دادن ژنهای *Notch1* و *Jagged1* در رده سلولی SW480 باعث تضعیف مهاجرت و تهاجم سلولهای سرطانی می شود که نتایج این مطالعه نیز همسو با نتایج این تحقیق می باشد (۴۵).

همان‌طور که مطالعات مذکور نشان می‌دهد درمان مولکولی هدفمند یک فناوری جدید در حال پیشرفت برای درمان سرطان است. ژن‌درمانی یک درمان هدفمند است که در آن هدف یک ژن خاص است که دچار افزایش یا کاهش بیان در سلولهای توموری می‌شود. درمان مؤثر برای جلوگیری از رشد بستگی به شناسایی دقیق مولکول‌های تعیین‌کننده این فرآیند کشنده و درک شبکه‌های تنظیمی هدایت‌کننده‌ی فعالیت‌های این مولکول‌های عملکردی دارد (۱۸). یکی از مزایای استفاده از miRNA ها به‌عنوان اهداف درمانی در سرطان این است که یک miRNA می‌تواند چندین mRNA را هدف قرار دهد و همچنین یک mRNA می تواند هدف چند miRNA قرار گیرد (۳۴). بر اساس داده‌های پیش بالینی در سال ۲۰۱۳، miR-34a اولین miRNA ای بود که به فاز I آزمایش بالینی در بیماران مبتلا به سرطان کبد با حمایت مالی Austin miRNA Therapeutics،TX، USA رسید. miRNA MIRX34 Therapeutics یک مقلد از miR-34a است که در یک کپسه لیپوزوم محصورشده که توسط Marina Biotech (Bothell,WA,USA) ایجادشده است که با استفاده از وکتور Nov340 Liposome حاوی miR-34a روی سلولهای سرطانی کبد و موش‌هایی که سرطان کبد در آن‌ها القاشده بود به‌صورت Invitro وInvivo انجام یافت و نتایج نشان‌دهنده حذف تومور در موش‌ها و کاهش تکثیر، متاستاز و افزایش آپوپتوز در سلولهای سرطانی بود که نتایج مطالعه ما همسو با این مطالعه بود(۳). فان و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه روی سلولهای اپی تلیال لنز نشان دادند که miR-34a باعث پیشرفت مسیر میتوکندریایی آپوپتوز با فعال شدن کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ از طریق مهار بیان ژن *Notch2* در مسیر سیگنالی Notch می شود (۱۳).

مطالعه حاضر نشان می دهد افزایش miR-34a باعث کاهش مهاجرت، کاهش رشد و به طور غیر مستقیم باعث افزایش بیان ژنهای کاسپازی در سلولهای ترانسفکت شده HCT116 نسبت به سلولهای کنترل می شود و قابلیت تومورزایی را کاهش می دهد. با این وجود مطالعات بیشتر در بررسی اثر

miR-34a بر آپوپتوز سلولهای سرطان کلون و دیگر سرطانها پیشنهاد می گردد تا شاید miR-34a بتواند به‌عنوان یک هدف در ژن درمانی سرطان کلون مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به جهت تهیه مقدمات و دستگاههای مورد نیاز برای انجام این تحقیق صمیمانه تشکر می نمایند.

منابع

1. Aghajani, H., Etemad, K., Goya, M., Ramezani, R., Modirian, M. and Nadali, F. 2011. Iranian Annual Cancer Registration Report 2008-2009 Ministry Of Health & Medical Education Health DeputyCenter for disease control and prevention. Tehran: Tandis; 25–120.

2. Bonora, M., Wieckowsk, M.R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L. and Pinton, P. 2015. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. Oncogene. 1608: 12-13.

3. Bouchie, A. 2013. First microRNA mimic enters clinic. Nature Biotechnology. 31(7): 577. doi: 10.1038/nbt0713-577.

4. Boyle, P. and Langman, J.S. 2000. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. British Medical Journal. 321(7264): 805-808.

5. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A.J. 2018. Global cancer statistics GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 68:394–424.

6. Brenner, H., Kloor, M. and Pox, C.P. 2014. Colorectal cancer. Lancet. 383(9927):1490-1502.

7. Calin, G.A. and Croce, C.M. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. Nature Reviews Cancer. Nov;6(11):857-66.

8. Check, H. E. 2008. Cancer complexity slows quest for cure. Nature. 455(7210):148. doi:10.1038/455148a.

9. Croce, C.M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. Nature Reviews Genetics. 10(10):704-14. doi: 10.1038/nrg2634.

10. Deng, X., Zheng, H., Li, D., Xue, Y., Wang, Q., Yan, S., Zhu, Y. and Deng, M. 2018. MicroRNA-34a regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by targeting silent information regulator 1. Experimental and Therapeutic Medicine. 15(4):3705-3714.

11. Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. 2006. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. Nature Reviews Cancer. 6(4):259-269.

12. Fakheri, H., Janbabai, G., Bari, Z. and Eshqi, F. 2008. The epidemiologic and clinical-pathologic characteristics of colorectal cancers from 1999 to 2007 in Sari, Iran. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 18(67):58-66.

13. Fan, F., Zhuang, J., Zhou P., Liu X. and Luo, Y. 2017. MicroRNA-34a promotes mitochondrial dysfunction-induced apoptosis in human lens epithelial cells by targeting Notch2. Oncotarget. 8 (66): 110209-110220.

14. Finotti, A., Fabbri, E., Lampronti, I., Gasparello, J., Borgatti, M. and Gambari, R. 2019. MicroRNAs and Long Non-coding RNAs in Genetic Diseases. Molecular Diagnosis & Therapy. 1-17.

15. Haghighi, M.M., Mohebbi, S.R., Najjar Sadeghi, R., Vahedi, M., Ghiasi, S. and Zali, M.R. 2009. Association between the G1793A genotype of MTHFR gene in patients with sporadic colorectal cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 3:147-151.

16. Hammond, W,A., Swaika, A. and Mody, K. 2016. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 8(1):57-84.

17. He, L., He, X., Lowe, S.W. and Hannon, G.J. 2007. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. Nature Reviews Cancer. 7(11):819-822.

18. Iio, A., Nakagawa, Y., Hirata, I., Naoe, T. and Akao, Y. 2010. Identification of non-coding

RNAs embracing microRNA-143/145 cluster. Molecular Cancer. 9:136.

19. Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M. and Croce, CM. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Research. 65(16):7065-7070.

20. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. and Thun, M.J. 2008. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 58(2):71-96.

21. Keshtkar, A., Semnani, S., Roshandel, G., Aboomardani, M., Abdolahi, N., Besharat, S., Moradi, A.A.V., Kalavi, K.H., Besharat, S. and Mirkarimi, H.S. 2009. Nutritional characteristics in patients with colorectal cancer in Golestan Province of Iran, a case-control study. journal of Gorgan University of Medical Sciences. 11(2): 38-44.

22. Lee, E.J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G.J, Lerner, M.R., Frankel, W.L., Morgan, D.L., Postier, R.G., Brackett, D.J. and Schmittgen, T,D. 2007. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. International Journal of Cancer. 120(5):1046-1054.

23. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. and Golub, T.R. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature. 435(7043):834-838.

24. Lv, T., Song, K., Zhang, L., Li, W., Chen, Y., Diao, Y., Yao, Q. and Liu, P. 2018. miRNA-34a decreases ovarian cancer cell proliferation and chemoresistance by targeting HDAC1. Biochemistry and Cell Biology. 96(5):663-671.

25. Ma, Z.B., Kong, X.L., Cui, G., Ren, C.C., Zhang, Y.J., Fan, S.J. and Li, Y.H. 2014. Expression and clinical significance of miRNA-34a in colorectal cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 15(21):9265-9270.

26. Macfarlane, L.A. and Murphy, P.R. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics. 11(7):537-561.

27. Mansoori, B., Mohammadi, A., Shirjang, S. and Baradaran, B. 2015. Micro-RNAs: The new potential biomarkers in cancer diagnosis, prognosis and cancer therapy. Cellular and Molecular Biology. 61(5):1-10.

28. Misso, G., Di Martino, M.T., De Rosa, G., Farooqi, A.A., Lombardi, A., Campani, V., Zarone, M.R., Gullà, A., Tagliaferri, P., Tassone, P. and Caraglia, M. 2014. Mir-34: a new weapon against cancer? Molecular Therapy- Nucleic Acids. 23;3:e194. doi: 10.1038/mtna.2014.47.

29. Mohammadi, A., Mansoori, B. and Baradaran, B. 2016. The role of microRNAs in colorectal cancer. Biomedicine Pharmacotherapy. 84:705-713.

30. Mousavi, S.M., Gouya, M.M., Ramazani, R., Davanlou, M., Hajsadeghi, N. and Seddighi, Z. 2008. Cancer incidence and mortality in Iran. Annals of Oncology. 20(3):556-563.

31. Nicoloso, M.S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S. and Calin, G.A. 2009. MicroRNAs-the micro steering wheel of tumour metastases. Nature Reviews Cancer.9(4):293-302.

32. Osaki, M., Takeshita, F., Sugimoto, Y., Kosaka, N., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Kobayashi, E., Yamada, T., Kawai, A., Inoue, T., Ito, H., Oshimura, M. and Ochiya, T. 2011. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. Molecular Therapy. 19(6):1123-1130.

33. Qiu, T., Zhou, X., Wang, J., Du, Y., Xu, J., Huang, Z., Zhu, W., Shu, Y. and Liu, P. 2014. MiR-145, miR- 133a and miR- 133b inhibit proliferation, migration, invasion and cell cycle progression via targeting transcription factor Sp1 in gastric cancer. FEBS Letters. 588(7):1168-1177.

34. Reid, G., Kirschner, M.B. and van Zandwijk, N. 2011. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 80(2):193-208.

35. Rezanejad Bardaji, H., Asadi, M.H., Yaghoobi, M.M. 2018. Long Non-coding RNA ZEB1-AS1 Promotes Tumorigenesis and Metastasis in Colorectal Cancer. Journal of Genetic Resources. 4(1):1-6.

36. Safaei, A., Moghimi, D.B., Fatemi, S., Ghiasi, S. and ZALI, M.R. 2007. Epidemiology of

colorectal Cancer :Study the recorded cases in 1379-86. Tabib-E-Sharg. 9(3): 209-216.

37. Shenouda, S.K. and Alahari, SK. 2009. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer Metastasis Reviews. 28(3-4):369-378. doi: 10.1007/s10555-009-9188-5.

38. Slabakova, E., Culig, Z., Remsík, J., and Soucek, K. 2017. Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. Cell Death Disease. 9 (8): 783. doi:10.1038/cddis.

39. Steeg, P.S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nature Medicine. 12(8):895-904.

40. Tafrihi, M. and Hasheminasab, E. 2019. MiRNAs: Biology, Biogenesis, their Web-based Tools, and Databases. MicroRNA. 8(1):4-27. doi: 10.2174/2211536607666180827111633.

41. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Research. 64(11):3753-3756.

42. Talanian, R. V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M. C., Mankovich J. A., Banach D. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. Journal of Biological Chemistry. 272: 9677-9682.

43. Tufman, A., Tian, F. and Huber, R.M. 2013. Can microRNAs improve the management of lung cancer patients? A clinician's perspective. Theranostics.3(12):953-963.

44. Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M,. Prueitt, R.L, Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C. and Croce, C.M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. 103(7):2257-2261.

45. Wang, C.J., Zhou, Z.G., Wang, L., Yang, L., Zhou, B., Gu, J., Chen, H.Y. and Sun, X.F. 2009. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. Disease Markers. 26(1):27-34.

46. Zhang, X., Ai, F., Li, X., Tian, L., Wang, X., Shen, Sh. And Liu, F. 2017. MicroRNA-34a suppresses colorectal cancer metastasis by regulating Notch signaling. Oncology Letters. 14: 2325-2333.

MiRNA-34a replacement effect on growth and migration inhibition and increasing of Caspase gene expression in HCT116 colon cancer cell line

Jafarpour N.[1], Onsori H.[2] and Baradaran B.[3]

[1] **Dept. of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. of Iran**

[2] **Dept. of Cell and Molecular Biology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, I.R. of Iran**

[3] **Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R. of Iran**

Abstract

Colorectal cancer as the most common cancer of the digestive tract is the fourth leading cause of death in the world. According to studies, miRNA-34a (miR-34a) expression declines in colon cancer. The aim of this study was to investigate the effect of miR-34a on growth and migration inhibition and apoptosis induction of colon cancer cells. In this experimental study, HCT116 human colorectal cancer cells were used in RPMI1640 medium. MiR-34a transmission into cancer cells was performed by the jetPEI transfection reagent. MTT assay to determine the survival of cancer cells and the qRT-PCR test to confirm the transfer of miR-34a to the cells and also an investigation of the expression of Caspase genes were used. Finally, the Wound healing test in order to investigate the migration status of transfected and control cells was performed. The expression changes of the intended genes in the transfected cells were compared with the control cells using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The MTT test showed that induction of miR-34a, dose-dependent, causes the death of colorectal cancer cells. Also, the results of the qRT-PCR test revealed a significant increase of miR-34a in the HCT116 transfected cells compared to the control cells as well as increased expression of Caspase-3, -8 and -9 genes in transfected cells. Ultimately, the results of the Wound healing test showed reduced migration of transfected cells compared to the control cells. The study showed that miRNA-34a plays an important role in inhibiting the growth and migration of colon cancer cells and can be a good candidate for molecular therapies.

Keywords: miRNA-34a, Colon Cancer, HCT 116, cell migration, caspase