

تأثیر پپتید آنتاگونیست VEGFB بر میزان بیان *miR-210* در سرطان پستان مدل موشی

فاطمه کبودان^۱، سهیلا طالش ساسانی^۲ و سید محسن اصغری^۲

^۱دانشکده علوم زیستی، واحد تکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تکابن، ایران؛ ^۲گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران؛

^۳مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: سهیلا طالش ساسانی، sasani@guilan.ac.ir

چکیده. سرطان پستان چهارمین سرطان شایع در سراسر جهان است و زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌های پستان به طور غیر قابل کنترل تقسیم شوند و تومور تشکیل بدeneند. رگ‌زایی یکی از عوامل مهم در رشد و حفظ هموستاز سلول در شرایط طبیعی و پاتولوژیک است و VEGFs از مهم‌ترین عوامل موثر در رگ‌زایی هستند. miR-210 از طریق ارتباط با VEGF در رگ‌زایی نقش مهمی ایفا می‌کند. در این مقاله تغییرات بیان *miR-210* در پاسخ به پپتید ضد رگ‌زایی آنتاگونیست VEGFB (موسوم به VEGB1) در موش‌های ماده نژاد BALB/c. دارای تومور پستان القاء شده با رده سلولی 4T1 مطالعه شد. گروه تحت درمان مقداری ۱mg.kg^{-۱} و ۱۰mg.kg^{-۱} از پپتید و گروه کنترل، PBS را به طریق درون صفاتی (ip) به مدت دو هفته دریافت کردند. چهارده روز پس از تیمار، بافت پستانی از هر دو گروه حیوانات جداسازی و میزان بیان *miR-210* بررسی شد. تحلیل آماری نتایج با استفاده از One Way ANOVA تیمار، با وجود اختلاف معنادار در میزان بیان *miR-210* میان گروه‌های تیمارشده با مقدار مختلف VEGB1 بود. همچنین بیان این ژن میان گروه‌های تیمار شده با پپتید با توجه‌های شاهد تفاوت معنی دار داشت ($p<0.05$). در موش‌های تیمار شده با یک میلی‌گرم بر کیلوگرم از VEGB1 میزان بیان *miR-210* درصد کاهش بیان داشت، اما کاهش ۹۰ درصدی بیان *miR-210* در موش‌های تیمار شده با ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم VEGB1 مشاهده گردید که نشان‌دهنده عملکرد مهاری پپتید آنتاگونیست VEGB1 در مقدار مختلف است.

واژه‌های کلیدی.. تحلیل آماری، تنظیم بیان ژن، رگ‌زایی، متاستاز، هیپوکسی

The effect of a VEGFB antagonist peptide on the expression level of *miR-210* in a mouse model of breast cancer

Fatemeh Kaboudan¹, Soheila Talesh Sasani² & Seyed Mohsen Asghari^{2,3}

¹Faculty of Biological Science, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran; ²Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran; ³Iran Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondent Author: Soheila Talesh Sasani, sasani@guilan.ac.ir

Abstract. Breast cancer is the fourth common cancer worldwide and occurs when breast cells begin to uncontrolled division and tumor formation. Angiogenesis is one of the essential factors in cell growth and maintenance of homeostasis in the natural and pathological conditions, while VEGFs are the most critical factors in angiogenesis. MiR-210 plays an important role in the angiogenesis via association with VEGF. Here, the *miR-210* expression changes in response to a VEGFB antagonist peptide, called VEGB1, was studied in female BALB/c mice bearing 4T1 cell line induced breast tumor. The treated group received 1mg.kg⁻¹ and 10mg.kg⁻¹ of the peptide and the control group received PBS intraperitoneally during two weeks. Both of the animal groups underwent a resection of breast tissue 14 days after treatment and *miR-210* expression level was investigated. Statistical analysis by On-way ANOVA showed that the expression level of *miR-210* gene had significant differences among the groups treated with various doses of VEGB1. Also, the gene expression was significantly different between peptide-treated groups and control samples ($p<0.05$). *MiR-210* expression level had 42% reduction in mice treated with 1mg.kg⁻¹ of VEGB1, while 90% was seen in mice treated with 10mg.kg⁻¹ of VEGB1 showing the inhibitory function of VEGB1 antagonist peptide at different doses.

Key words. angiogenesis, regulation of gene expression, hypoxia, metastasis, statistical analysis

مقدمه

رگ‌زایی تنظیم می‌گردد و درصورتی که این تعادل از بین برود زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله رشد و متاستاز تومور فراهم می‌شود (Odorisio et al., 2006).

متاستاز نقش ویژه در گسترش سرطان‌های دارد که منجر به مرگ می‌گردد. در طی روند متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق عروق خونی مهاجرت نموده و به سایر بافت‌ها وارد می‌شوند و در نهایت باعث درگیر شدن بافت‌های سالم بدن می‌گردد (Baharara et al., 2012). از این‌رو مهار رگ‌زایی و متعاقب آن مهار متاستاز سلول‌ها روش مناسبی برای مقابله با سرطان است و شناخت عوامل درگیر در رگ‌زایی نرمال و یا غیر نرمال بسیار مهم و حیاتی است. فاکتورهای رگ‌زایی بهوسیله سلول‌های توموری در محیط رها شده و انواع مختلف سلول‌های نرمال را تحریک می‌کنند. از جمله عواملی که باعث القای رگ‌زایی می‌شود TNF α هیپوکسی است. چندین ترکیب آنژیوژنیک مانند VEGF (Tumor Necrosis Factor- α)، Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) و Fibroblast Growth Factor (FGF) توسط هیپوکسی القا می‌شوند. هیپوکسی، رگ‌زایی را فعال کرده و باعث متاستاز می‌شود. در شرایطی که اکسیژن اطراف سلول وجود داشته باشد فاکتور القا شونده با هیپوکسی، هیدروکسیل شده و در نتیجه تجزیه می‌شود، در حالی که در شرایط کمبود اکسیژن این فاکتور هیدروکسیل نشده و در نتیجه پایدار بوده و به هسته مهاجرت کرده و باعث القای فاکتورهای مؤثر در رگ‌زایی می‌شود. تغییرات آنکوژنیک سلول‌های توموری ممکن است از طریق فاکتورهای موثر بر رگ‌زایی در القا و گسترش آن نقش داشته باشند. جهش در زن‌های آنکوژنیک K-ras و H-ras و V-ras در TP53 می‌گردد. همچنین جهش در ژن سرکوبگر VEGF منجر به کاهش تولید TSP-1 و افزایش بیان VEGF شده و در نتیجه رگ‌زایی فعال می‌شود (Kerbela et al., 2000). فاکتور رشد عروق آندوتیالی (VEGF) فاکتور آندوتیالی ویژه‌ای است که رگ‌زایی فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی را القا می‌کند و موجب افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود (Leung et al., 1989).

فاکتور رشد سلول‌های آندوتیالی عروق، خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌های همودایمر شامل فاکتورهای ضروری برای رگ‌زایی عروق خونی و عروق لنفاوی از عروق موجود است.

در حال حاضر به عنوان VEGFA شناخته شده است و عضو خانواده بزرگ‌تر از عوامل رشد است که همچنین شامل VEGFC، VEGFB، VEGFD و فاکتور رشد جفت (PIGF) است. VEGF عملکردهای کلیدی سلول‌های توموری را تنظیم می‌کند. گزارش‌های اولیه درباره تاثیر VEGF بر روی

سرطان عمده‌ترین عامل مرگ‌ومیر در کشورهای پیشرفته اقتصادی و دومین عامل مرگ در کشورهای در حال توسعه، پس از بیماری‌های قلبی-عروقی است (Stewart & Wild, 2014).

سرطان ریه در مردان و سرطان پستان در زنان عمده‌ترین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان محسوب می‌شوند (Smith et al., 2017). در ایران سرطان پستان رتبه اول بیماری‌های سرطانی در زنان محسوب می‌شود (Noroozi et al., 2011). با به کارگیری روش‌های موجود در کنترل سرطان مانند اجرای برنامه‌هایی برای کنترل مصرف دخانیات، واکسیناسیون در سرطان‌های کبد و دهانه رحم، تشخیص و درمان زود هنگام، و نیز ترویج فعالیت‌های فیزیکی و رژیم غذایی سالم‌تر می‌توان به میزان قابل توجهی از بروز سرطان پیش‌گیری کرد (Desantis et al., 2011). طبق محاسبات انتیتو ملی سرطان آمریکا، از هر هشت زن یک نفر در زندگی خود مبتلا به سرطان پستان می‌شود (Smith et al., 2017). این بیماری درصورتی که به موقع تشخیص داده شود به راحتی با استفاده از روش‌های عمل جراحی، شیمی‌درمانی و پرتو درمانی قابل درمان است (Kolahdoozan, 2010). امروزه روش‌های درمانی مبتنی بر استفاده از ترکیبات گیاهی تاثیرگذار بر گسترش سرطان (از طریق توقف چرخه سلولی، مهار رگ‌زایی و القای آپوپتوز) نیز مورد توجه محققین هستند (Meimandi & Yaghoobi, 2019).

رگ‌های جدید در بزرگسالان از شبکه عروقی جنبی ایجاد می‌گردد (Carmeliet & Jain, 2011). رگ‌زایی (آنژیوژن)، فرایندی است که در آن سلول‌های آندوتیال به صورت پیش‌سازی‌های اولیه آندوتیالی که آنژیو بلاست نام دارند از نو تشکیل می‌شوند (Bauer et al., 2005). طی این فرایند آنژیو بلاست‌ها تکثیر یافته و با هم ائتلاف کرده ساختارهای اولیه رگی را ایجاد می‌نمایند (Carramolino et al., 2010). پس از شکل‌گیری شبکه رگی اولیه، در طی فرایند رگ‌زایی، با جوانهزنی رگ‌های Egginton, 2009. در افراد بالغ رگ‌زایی محدود است و فقط در طی سیکل تخدمان (Kamat et al., 2011) و فرایندهای ترمیمی Baharara et al., 2012 در این افراد تغییرات اندکی در سلول‌های آندوتیالی رخ می‌دهد، در واقع این سلول‌ها در بلوغ خاموش هستند ولی توانایی فعال شدن در پاسخ به عوامل مناسب را دارند به عبارت دیگر می‌توان رگ‌زایی را یک فرایند ضروری در فیزیولوژی بدن دانست که با واسطه تعادل بین فاکتورهای القاکننده و مهارکننده

مواد و روش‌ها

در این مطالعه موش‌های ماده نژاد c.Balb/c، دارای تumor پستان القاء شده با رده سلولی 4T1 مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از رشد تومور به حدود ۴۰۰ میلی‌متر مکعب، گروه تیمار پیتید ضرگزایی آنتاگونیست VEGFB1 (با دو مقدار $1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ و $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) و گروه کنترل، PBS را روزانه به صورت درون صفاقی (ip) و به مدت دو هفته دریافت کردند. هر گروه شامل ۳ موش و مجموعاً ۹ موش بررسی شدند. سپس با استفاده از ترازوی دیجیتال میزان ۵۰ میلی‌گرم از بافت توموری و نیز ۵۰ میلی‌گرم از بافت پستان نمونه‌های کنترل توزین و مطالعه شدند. پیتید مورد استفاده، توسط محققین پیشین طراحی شده بود (Assareh et al., 2019). در این تحقیق کلیه موارد مربوط به اخلاق کار با حیوانات رعایت گردید. این تحقیق دارای شناسه اخلاق به شماره IR.GUMS.REC.1398.425 از دانشگاه علوم پزشکی گیلان است.

استخراج miRNA و ساخت cDNA

استخراج miRNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت "High pure miRNA isolation" طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام و کمیت و کیفیت miRNA به کمک دستگاه نانوراپ و الکتروفورز روی ژل آکارز ۲ درصد ارزیابی شد. باقیمانده احتمالی DNA در محصول استخراج با استفاده از آنزیم DNase حذف شد. اضافه کردن دنباله polyA به RNA‌های کوچک فاقد دنباله با استفاده از آنزیم Poly A polymerase و سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت "Thermo Fisher Science, USA" و مطابق دستورالعمل شرکت انجام یافت. در این مرحله ۵'- oligo dt دنباله‌دار (GCGTCGACTAGTACAACCAAGGTTCTCCA Ramezani et al., 2020) استفاده گردید ().

مطالعه بیان miR-210 به کمک روش Real-time PCR

پرایمرهای اختصاصی برای miR-210 و ژن U6 (به عنوان ژن کنترل داخلي) با استفاده از نرم افزار Oligo Primer Analysis V.7.54 طراحی شدند. پس از بررسی اختصاصی بودن پرایمرها از طریق نرم افزار NCBI Blast، پرایمرها توسط شرکت ماکروژن ساخته شدند. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

برای اطمینان از صحت مراحل استخراج miRNA سنتز cDNA و نیز ارزیابی کارآیی پرایمرها، ابتدا RT-PCR طبق برنامه دمایی با واسرشت‌سازی اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (سیکل)، ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد

سلول‌های توموری نشان داد که می‌تواند رشد، بقا و مهاجرت سلول‌های سرطانی را افزایش دهد (Fukasawa et al., 2007). micro RNA (miRNA)‌ها می‌توانند هر دو نقش آنکوژنی و سرکوبگر توموری را داشته باشند که در این صورت به ترتیب Tumor suppressor miR و oncomiR خوانده می‌شوند. اولین گزارش مربوط به دخالت miRNA‌ها در سرطان پستان نشان داد که عدم تنظیم مناسب عدد miRNA در این بیماری موثر بودند (Almeida et al., 2011). میکرو ریبونوکلئیک اسیدها (miRNA‌ها)، ریبونوکلئیک اسیدهای غیرکدکننده‌ای هستند که دارای طولی برابر ۱۸-۲۵ نوکلئوتید هستند. میکرو RNA‌ها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها، کنترل می‌کنند. این ساختارهای ملکولی در کنترل فرایندهای مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلولی شرکت نموده، بسیاری از آنها می‌توانند به عنوان آنکوژن و یا مهارکننده‌ای توموری عمل نمایند. miRNA‌ها پتانسیل قابل توجهی برای استفاده به عنوان نشانگر زیستی (بیومارکر) جهت شناسایی، تشخیص، طبیقه‌بندی و درمان سرطان دارند. miRNA‌ها علاوه‌بر تعیین نوع بیماری، حساسیت و پاسخ به یک درمان خاص را نیز می‌توانند تعیین کنند (Sempere & Kauppinen, 2009).

ژن miRNA-210 در انسان بر روی کروموزوم شماره ۱۱ و در موش بر روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد. با توجه به ژن‌های هدف، miR-210 در فرایندهایی مانند رگزایی، ترمیم DNA، تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوز نقش ایفا می‌کند. یکی از ژن‌های هدف عوامل القا شونده توسط هیپوکسی، miR-210 است. در شرایط هیپوکسی (HIF-1) فعال به محل اتصالش در پرومотор miR-210 متصل شده و بیان miR-210 را افزایش می‌دهد. افزایش miR-210 موجب تغییر بیان چندین ژن دخیل در پاسخ‌های سلول به هیپوکسی می‌شود. یکی از اثرات miR-210 در شرایط هیپوکسی غلبه بر توقف سیکل سلولی ایجاد شده در انر هیپوکسی است. این عمل با مهار یک فاکتور نسخه برداری موسوم به MNT (MAX network transcriptional repressor) همچنین در سرطان پستان و ملانوما میزان بیان این miRNA با پیش‌آگهی بیماری در ارتباط است. در ارتباط هیپوکسی با بدحیمی (تومور)، دیده شده که سطوح miR-210 با کاهش پیشرفت در نمونه‌های سرطان پستان و ملانوما مرتبط است (Bianchi et al., 2009).

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پیتید ضرگزایی آنتاگونیست VEGF-B بر بیان miR-210 در موش‌های دارای سرطان پستان القاء شده با رده سلولی 4T1 و نقش آن در رگزایی سلول‌های سرطانی است.

موش‌های دریافت کننده مقادیر مختلف از پپتید VEGB1 و نیز موش‌های کنترل در شکل ۱ مشاهده می‌شود. با توجه به نمودار حاصل چرخه آستانه (Ct) در نمونه‌های کنترل برای miR-210 ۲۱/۵ است. اما در گروه تحت تیمار با پپتید ضرگزایی ۱۰ جفت باز، محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی miR-210 و ۹۳ جفت باز برای زن U6 بودند.

مقدار بیان زن است.

همچنین آنالیز نتایج نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در مقدار بیان miR-210 در موش‌های تیمار شده با پپتید نسبت به گروه کنترل بود ($p < 0.05$). در تحلیل بیشتر از داده‌های این تحقیق مشخص شد که بیان زن مذکور در پاسخ به مقادیر مختلف پپتید تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد. به طوری که بیان miR-210 در VEGB1 موش‌های تیمار شده با مقدار 10 mg kg^{-1} از پپتید ۱ کاهش معنی‌دار نسبت به گروه دریافت کننده مقدار 1 mg kg^{-1} از پپتید داشت ($p = 0.000$). از سوی دیگر مقایسه میزان بیان $2^{\Delta\Delta Ct}$ miR-210 در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل به روش $\Delta\Delta Ct$ انجام شد. بیان miR-210 در نمونه‌های تحت تیمار به مقدار 1 mg از پپتید مهارکننده 58 درصد و در مقدار 10 mg از مهارکننده، حدود 10 درصد نسبت به گروه کنترل بود. این نتایج نشان‌دهنده کاهش بیان miR-210 در نمونه‌های تحت تیمار است. این ارزیابی 42 درصد کاهش بیان miR-210 در حضور ۱ میلی‌گرم از پپتید VEGB1 را نشان داد در حالی که مقدار کاهش بیان در موش‌های دریافت کننده 10 میلی‌گرم از پپتید حدود 90 درصد بود (شکل ۲).

بحث

سرطان پستان پیشرفته و متاستاتیک در حال حاضر غیرقابل درمان اما قابل کنترل است (Bray et al., 2018). با توجه به اهمیت این سرطان، در تحقیق حاضر مکانیسم مولکولی عملکرد پپتید ضرگزایی آنتاگونیست VEGF موسوم به miR-210 در موش‌های القا شده با تومور پستان مورد مطالعه قرار گرفت. این پپتید به هر دو نوع گیرنده VEGFR1 و VEGFR2 متصل می‌شود. رگزایی در شرایط فیزیولوژیک، شامل تشکیل کنترل شده عروق خونی از عروق موجود است. این فرایند پایه و اساس چندین فرایند فیزیولوژیک از قبیل رشد و نمو جنین، تشکیل جفت و ترمیم زخم است. پروتئین VEGF مانند سایر مدیاتورهای پروتئینی، اثرات زیستی خود را از طریق اتصال به گیرنده خود در سطح سلول آندوتیال اعمال می‌کند. این گیرندها از ابرخانواده

برای واشرشت سازی ثانویه (۳۰ ثانیه)، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد (۲۰ ثانیه)، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۲۰ ثانیه) و سرانجام بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترسیمهایکل انجام و محصول آن با استفاده از ژل ۲/۵ درصد آگارز الکتروفورز شد. قطعه‌ای به طول ۱۱۰ جفت باز، محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی miR-210 و ۹۳ جفت باز برای زن U6 بودند.

واکنش Real Time PCR

به منظور بررسی بیان زن miR-210 واکنش Real-time PCR، با دستگاه Light Cycler 96 انجام شد. حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Master Premix و ۰/۸ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رو به جلو و برگشتی با غلظت 1 pmol/l ، ۵ میکرولیتر (۱۰۰ ng) cDNA و $7/4$ میکرولیتر آب دیونیزه بود. واکنش تحت شرایط دمایی واشرشت سازی اولیه (۹۴ درجه ۵ دقیقه (سیکل)، ۴۰ سیکل با واشرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه (۳۰ ثانیه) دمای اتصال (۶۱ درجه (۲۰ ثانیه)، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه ۲۰ ثانیه و سپس بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول واکنش PCR به همراه مارکر وزن مولکولی (Cinnagen, Iran) ۵۰bp درصد الکتروفورز شد.

آنالیز آماری

برای سنجش نرمال بودن داده‌ها از آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov در نرم افزار SPSS (v.23) استفاده گردید. سپس به کمک آزمون One Way ANOVA داده‌ها آنالیز شدند. مقدار $p < 0.05$ برای معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد. نمودار مربوط به تغییرات بیان زن‌ها با نرم افزار Prism V.6 رسم گردید و همچنین از روش $2^{\Delta\Delta Ct}$ میزان تغییرات بیان زن‌های مورد مطالعه بر حسب fold change محاسبه شد.

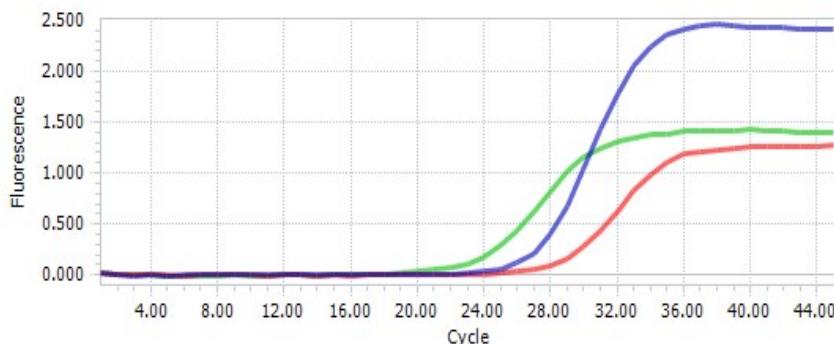
نتایج

در این تحقیق، برای بررسی تاثیر ضرگزایی پپتید آنتاگونیست VEGFB1 بر بیان miR-210 از بافت پستان توموری موش‌های ماده نژاد Balb/c، که با استفاده از رده سلولی 4T1 سرطان پستان در آنها القا شده بود، استفاده گردید. پس از استخراج miRNA کیفیت و کمیت آن بررسی شد. جذب نوری (۲۶۰/۲۸۰ nm) نمونه‌ها برابر با ۱۰/۹۷ و میانگین غلظت آنها برابر با ۱۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. سنتر cDNA و واکنش Real time PCR انجام شد. منحنی تکثیر برای بیان miR-210 در

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

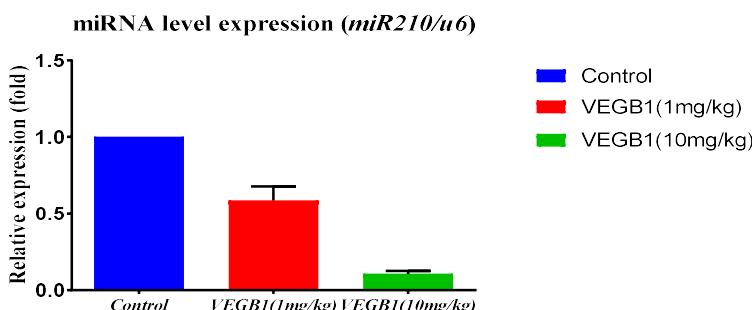
Table 1- Used primers in this study

Gene	Primer	Sequence	Tm (°C)
<i>miR-210</i>	Forward	5'-CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA-3'	67.7
	Revers	5'-GCGTCGACTAGTACAACCTCAAG-3'	62.1
<i>U6</i>	Forward	5'-GGTGGGAAGTGAGGGAGAGGG-3'	67.2
	Revers	5'-GCGTCGACTAGTACACAAG-3'	62.1



شکل ۱- منحنی تکثیر *miR-210* در نمونه‌های مورد مطالعه. سبز: کنترل. آبی: تیمار شده با ۱ از *VEGB1*. قرمز: تیمار شده با ۱۰ از *VEGB1* mg kg^{-1} .

Figure 1. Amplification curve of *miR-210* in the studied samples: **Green**. Control. **Blue**. treated with 1 mg kg^{-1} of *VEGB1*. **Red**. treated with 10 mg kg^{-1} of *VEGB1*.



شکل ۲- اثر پپتید مهارکننده رگ‌زایی *VEGB1* بر بیان *miR-210* در بافت تومور نسبت به گروه کنترل.

Figure 2. The effect of angiogenesis inhibitory peptide, *VEGB1*, on *miR-210* expression in tumoral tissue relative to the control group.

های فاکتور رشد آندوتیالیال عروق نوع ۱ و ۲ به طور موثری در سرکوب رگ‌زایی تومور نقش دارند (Prewett et al., 1999; Folkman, 1971). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند با مهار رگ‌زایی از متاستاز جلوگیری کند (Baharara et al., 1990; Shibuya et al., 1990) (2019). مداخله در مسیرهای سیگنالینگ VEGFs یک استراتژی مهم در مهار رگ‌زایی و متاستاز سلول‌های توموری است. محققین پیتیدهای با قابلیت اتصال به هر دو گیرنده، VEGFR-1 و VEGFR-2 (Folkman, 1971, 1990) بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که سرکوب گیرنده‌

گیرنده‌های تیروزین کینازی هستند و تمامی VEGFR‌ها شدیداً همولوگ هستند. حذف هتروزیگوت ژن VEGFR، منجر به مرگ جنین موش‌ها بین روزهای ۸ و ۹ می‌گردد که ناشی از اختلال رگ‌زایی است (Shibuya et al., 1990). استفاده از مهار تشکیل عروق توموری جهت درمان سرطان و نیز با توجه به فعالیت زیستی بالای پیتیدها و عوارض پایین، و هزینه پایین درمان، می‌توان پیتیدها را به عنوان راهکار بسیار مناسبی برای درمان معرفی کرد (Folkman, 1971, 1990).

REFERENCES

- Aliati, M.A., Ishikawa, M., Masuda, H., Simon, D.I., Jian, M.K., Asahra, T. & Costa, M.A. 2012. Upregulation of miR-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded CD34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16: 2413- 2421.
- Almeida, M. I., Reis, R. M. & Calin, G. A. 2011. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 717: 1-8.
- Assareh, E., Mehrnejad, F., Mansouri, K., Esmaeili Rastaghi, A.R., Naderi-Manesh, H. & Asghari, S.M. 2019. A cyclic peptide reproducing the α 1 helix of VEGF-B binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 and inhibits angiogenesis and tumor growth. *Biochemical Journal* 476: 645-663.
- Baharara, J., Zafar-Balanejad, S., Nejad-Shahrokhbadi, K. & Hesami, Z. 2012. The effects of different doses of atorvastatin on angiogenesis of chorioallantoic membrane of chick embryo. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences* 14: 82-89.
- Baharara, J., Ramezani, T., Saghiri, N. & Salek, F. 2019. Investigating the apoptotic effects of silver nanoparticles coated with *Achillea biebersteinii* extract on A2780 ovarian cancer cells. *Nova Biologica Reperta* 6: 140-147. (In Persian).
- Bauer, S.M., Bauer, R.J. & Velazquez, O.C. 2005. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vascular and Endovascular Surgery* 39: 293-306.
- Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzi, M., Focaccia, E., Balalock, W. & Faenza, I. 2017. MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Research* 37: 6511-6521.
- Bianchi, N., Zuccato, C., Lampronti, I., Borgatti, M. & Gambari, R. 2009. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMB Reports* 42: 493-499.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L.A. & Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 68: 394-424.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298-307.
- Carramolino, L., Fuentes, J., García-Andrés, C., Azcoitia, V., Riethmacher, D. & Torres, M. 2010. Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. *Circulation Research* 106: 1197-201.
- Desantis, C., Siegel, R., Bandi, P. & Jemal, A. 2011. Breast cancer statistics, 2011. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 61: 408-418.
- Egginton, S. 2009. Invited review: activity-induced angiogenesis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 457: 963-977.
- طراحی کرده و نشان دادند که این پپتیدها می‌توانند در مهار رگ‌زایی موثر باشند (Sadrrmomtaz et al., 2018). همچنین برخی محققین دیگر پپتید موسوم به VEGB1 را طراحی کرده و گزارش کردند که این پپتید همانند ناحیه مارپیچ آلفا (α helix) در VEGF- B به 4T1 باعث تشكیل عروق کوچک مانع رشد تومورهای پستانی می‌شود (Assareh et al., 2019). در این پژوهش با تحلیل بیشتر نتایج حاصل از بیان miR-210 تحت اثر پپتید ضد رگ‌زایی (VEGB1)، پس از مقایسه یک طرفه (ANOVA($p<0.05$))، نشان دهنده اختلاف بین گروهی بود، به مقایسه میانگین‌های هر گروه باهم پرداخته شد. نتایج حاصل از آزمون‌های آماری بیانگر بیشترین تفاوت و اختلاف معنی‌دار در میزان بیان ژن miR-210 مربوط به حضور پپتید VEGB1 به مقدار ۱۰ میکروگرم است ($p=0.000$). نتایج این تحقیق در مطابقت با نتایج تحقیقات دیگر مبنی بر ارتباط مستقیم VEGF و miR-210 در رگ‌زایی هستند. تحقیقات نشان داده است در سلول‌های CD34⁺ بیان miR-210 تحت تاثیر VEGF است (Alaiti et al., 2012). بنابراین می‌توان گفت با مسدود شدن گیرندهای VEGF، بیان miR نیز کاهش می‌یابد. گزارش شده است که افزایش VEGF موجب افزایش بیان miR-210 می‌شود (Zeng et al., 2014). همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که در فرایند رگ‌زایی در سرطان پستان بیان miR-210 به بیان بستگی دارد (Bavelloni et al., 2017). همچنین نشان داده‌اند که هیپوکسی باعث افزایش بیان VEGF شده و در نتیجه بیان miR-210 به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پپتید مورد استفاده، آنتاگونیست VEGFB، با تاثیر بر بیان ژن‌های مختلف موثر در رگ‌زایی، این فرایند را کاهش می‌دهد. بنابراین علاوه بر تایید مجدد اثر ضد رگ‌زایی پپتید مذکور که پیشتر گزارش شده بود، نشان داده شد که یکی از مکانیسم‌های عملکرد آن تاثیر غیرمستقیم بر بیان یکی از microRNA های بسیار مهم در رگ‌زایی یعنی miR-210 می‌تواند باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان و خانم لاله میرزا نژاد (آزمایشگاه ژنتیک) برای همکاری در اجرای این پژوهش قدردانی می‌شود.

- Folkman, J.** 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute* 82: 4-7.
- Folkman, J.**, 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285: 1182-1186.
- Fukasawa, M., Matsushita, A. & Korc, M.** 2007. Neuropilin-1 interacts with integrin β 1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biology & Therapy* 6: 1184-1191.
- Kamat, A., Rajoria, S., George, A., Suriano, R., Shanmugam, A., Megwali, U., Prakash, P.B., Tiwari, R. & Schantz, S.** 2011. Estrogen-mediated angiogenesis in thyroid tumor microenvironment is mediated through VEGF signaling pathways. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 137: 1146-1153.
- Kerbel, R. S.** 2000. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21: 505-515.
- Kolahdoozan, S., Sadjadi, A., Radmard, A.R. & Khademi, H.** 2010. Five common cancers in Iran. *Archives of Iranian Medicine* 13: 143-146.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. & Ferrara, N.** 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.
- Meimandi, K. & Yaghoobi, M.M.** 2019. The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Sedum album* L. on human stomach and breast carcinoma cell lines in vitro. *Nova Biologica Reperta* 6: 10-19. (In Persian).
- Noroozi, A., Jomand, T. & Tahmasebi, R.** 2011. Determinants of breast self-examination performance among Iranian women: an application of the health belief model. *Journal of Cancer Education* 26: 365-374.
- Odorisio, T., Cianfarani, F., Failla, C.M. & Zambruno, G.** 2006. The placenta growth factor in skin angiogenesis. *Journal of Dermatological Science* 41: 11-19.
- Prewett, M., Huber, J., Li, Y., Santiago, A., O'Connor, W., King, K., Overholser, J., Hooper, A., Pytowski, B., Witte, L. & Bohlen, P.** 1999. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Research* 59: 5209-5218.
- Ramezani, S., Talesh Sasani, S., Fakor, F. & Alizadehsefat, S.** 2020. Relationship of the expression of circulating hsa-miR-125a-3p and hsa-miR125b with breast cancer. *British Journal of Biomedical Science* 77: 41-43.
- Sadremomtaz, A., Kobarfard, F., Mansouri, K., Mirzanejad, L. & Asghari, S.M.** 2018. Suppression Of migratory and metastatic pathways via blocking VEGFR1 and VEGFR2. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 38: 432-441.
- Sempere, L.F. & Kauppinen, S.** 2009. Translational implications of microRNAs in clinical diagnostics and therapeutics. *Handbook of Cell Signaling* (2nd ed.). Elsevier.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushima, H. & Sato, M.J.O.** 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5: 519-524.
- Smith, R.A., Andrews, K. S., Brooks, D., Fedewa, S.A., Manassaram-Baptiste, D., Saslow, D., Brawley, O.W. & Wender, R.C.** 2017. Cancer screening in the United States: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 67: 100-121.
- Stewart, B. & Wild, C.P.** 2014. World cancer report. World Health Organization, Geneva.
- Wang, Z., Deng, M., Liu, Z. & Wu, S.** 2017. Hypoxia-induced miR-210 promoter demethylation enhances proliferation, autophagy and angiogenesis of schwannoma cells. *Oncology Reports* 37: 3010-3018.
- Zeng, L., He, X., Wang, Y., Tang, Y., Zheng, C., Cai1, H., Liu, J., Wang, Y., Fu, Y. & Yang, G-Y.** 2014. MicroRNA-210 overexpression induces angiogenesis and neurogenesis in the normal adult mouse Brain. *Gene Therapy* 21: 37-43.

How to cite this article:

Kaboudan, F., Talesh Sasani, S. & Asghari, S.A. 2021. The effect of a VEGFB antagonist peptide on miR-210 expression level in breast cancer in a mouse model. *Nova Biologica Reperta* 8: 13-19. (In Persian).

کبودان، ف.، طالش ساسانی، س. و اصغری، س.م. ۱۴۰۰. تاثیر پپتید آنتاگونیست VEGFB بر میزان بیان miR-210 در سرطان پستان مدل موشی.

یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸، ۱۳-۱۹.