

تأثیر پپتید آنتاگونیست VEGFB بر میزان بیان *miR-210* در سرطان پستان مدل موشیفاطمه کبودان<sup>۱</sup>، سهیلا طالش ساسانی<sup>۲</sup> و سید محسن اصغری<sup>۳،\*</sup><sup>۱</sup>دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران؛<sup>۳</sup>مرکز 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 به‌طور غیر قابل کنترل تقسیم شوند و تومور تشکیل بدهند. 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 مقادیر  $1\text{mg.kg}^{-1}$  و  $10\text{mg.kg}^{-1}$  از پپتید و گروه کنترل، PBS را به طریق درون صفاقی (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 بیانگر وجود اختلاف معنادار در میزان بیان *miR-210* میان گروه‌های تیمار شده با مقادیر مختلف VEGB1 بود. همچنین بیان این ژن میان گروه‌های تیمار شده با پپتید با نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌دار داشت ( $p < 0.05$ ). در موش‌های تیمار شده با یک میلی‌گرم بر کیلوگرم از VEGB1 میزان بیان *miR-210* ۴۲ 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 مهاري پپتید آنتاگونیست VEGB1 در مقادیر 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 cancerFateme Kaboudan<sup>1</sup>, Soheila Talesh Sasani<sup>2</sup> & Seyed Mohsen Asghari<sup>2,3</sup><sup>1</sup>Faculty of Biological Science, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran; <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran; <sup>3</sup>Iran 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  $1\text{mg.kg}^{-1}$  and  $10\text{mg.kg}^{-1}$  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  $1\text{mg.kg}^{-1}$  of VEGB1, while 90% was seen in mice treated with  $10\text{mg.kg}^{-1}$  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

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 قابل‌توجهی از بروز سرطان پیش‌گیری کرد (Desantis et al., 2011). طبق محاسبات انستیتو ملی سرطان آمریکا، از هر هشت زن یک نفر در زندگی خود مبتلا به سرطان پستان می‌شود (Smith et al., 2017). این بیماری در صورتی که به‌موقع تشخیص داده شود به‌راحتی با استفاده از روش‌های عمل جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی 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 جنینی ایجاد می‌گردد (Carmeliet & Jain 2011). رگ‌زایی (آنژیوژنز)، فرایندی است که در آن سلول‌های آندوتلیال به‌صورت پیش-سازهای اولیه آندوتلیالی که آنژیوبلاست نام دارند از نو تشکیل می‌شوند (Bauer et al., 2005). طی این فرایند آنژیوبلاست‌ها 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 جدید از رگ‌های اولیه، شبکه عروقی تکوین می‌یابد (Egginton, 2009). در افراد بالغ رگ‌زایی محدود است و فقط در طی سیکل تخمدان (Kamat et al., 2011) و فرایندهای ترمیمی فیزیولوژیکی همچون ترمیم زخم انجام می‌گیرد (Baharara et al., 2012). در این افراد تغییرات اندکی در سلول‌های آندوتلیالی 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

رگ‌زایی تنظیم می‌گردد و در صورتی 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 سرطان‌هایی دارد که منجر به مرگ می‌گردند. 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 می‌گردند (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 هیپوکسی است. چندین ترکیب آنژیوژنیک مانند  $TNF\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )، VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) و bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) 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، هیدروکسیله شده و در نتیجه تجزیه می‌شود، درحالی‌که در شرایط کمبود اکسیژن این فاکتور هیدروکسیله 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 مؤثر بر رگ‌زایی در القا و گسترش آن نقش داشته باشند. جهش در ژن‌های آنکوژنیک K-ras، H-ras و V-ras موجب القای بیان VEGF می‌گردد. همچنین جهش در ژن سرکوبگر TP53 منجر به کاهش تولید TSP-1 و افزایش بیان VEGF شده و در نتیجه رگ‌زایی فعال می‌شود (Kerbel, 2000). فاکتور رشد عروق آندوتلیالی (VEGF) فاکتور آندوتلیالی ویژه‌ای است که رگ‌زایی فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی را القا می‌کند و موجب افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود (Leung et al., 1989). فاکتور رشد سلول‌های آندوتلیال عروق، خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌های همودایمر شامل فاکتورهای ضروری برای رگ‌زایی عروق خونی و عروق لنفاوی از عروق موجود است. VEGF در حال حاضر به‌عنوان VEGFA شناخته‌شده است و عضو خانواده بزرگ‌تر از عوامل رشد است که همچنین شامل VEGFD، VEGFC، VEGFB و فاکتور رشد جفت (PIGF) است. VEGF عملکردهای کلیدی سلول‌های توموری را تنظیم می‌کند. گزارش‌های اولیه درباره تاثیر VEGF بر روی

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه موش‌های ماده نژاد Balb/c، دارای تومور پستان القاء شده با رده سلولی 4T1 مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از رشد تومور به حدود ۴۰۰ میلی‌متر مکعب، گروه تیمار پپتید ضدگرایی آنتاگونیست VEGFB1 (با دو مقدار  $1\text{mg.kg}^{-1}$  و  $10\text{mg.kg}^{-1}$ ) و گروه کنترل، PBS را روزانه به‌صورت 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. پپتید 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 نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز 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 از چهار oligo dt دنباله‌دار (5'-GCGTCGACTAGTACAACCTCAAGGTTCTTCCA GTCACGACG(T)18V-3') استفاده گردید (Ramezani et al., 2020).

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

پرایمرهای اختصاصی برای miR-210 و ژن U6 (به‌عنوان ژن کنترل داخلی) 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 کارایی پرایمرها، ابتدا RT-PCR طبق برنامه دمایی با واسرشت‌سازی اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۱ 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) می‌توانند هر دو نقش آنکوژنی و سرکوبگر توموری را داشته باشند که در این صورت به ترتیب oncomiR و Tumor suppressor miR خوانده می‌شوند. اولین گزارش مربوط به دخالت miRNA در سرطان پستان نشان داد که عدم تنظیم مناسب ۲۹ عدد miRNA در این بیماری موثر بودند (Almeida et al., 2011). میکرو ریبونوکلیک اسیدها (میکرو RNAها)، ریبونوکلیک اسیدهای غیرکدکننده‌ای هستند که دارای طولی برابر ۲۵-۱۸ 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 به‌عنوان آنکوژن و یا مهارکننده‌های توموری عمل نمایند. miRNA پتانسیل قابل توجهی برای استفاده به‌عنوان نشانگر زیستی (بیومارکر) جهت شناسایی، تشخیص، طبقه‌بندی و درمان سرطان دارند. miRNAها علاوه بر تعیین نوع بیماری، حساسیت و پاسخ به یک درمان خاص را نیز می‌توانند تعیین کنند (Sempere & Kauppinen, 2009).

ژن miR-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(Hypoxia) فعال به محل اتصال در پروموتور ژن 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 اثر هیپوکسی است. این عمل با مهار یک فاکتور نسخه برداری موسوم به MNT (MAX network transcriptional repressor) انجام می‌شود. همچنین در سرطان پستان و ملانوما میزان بیان این miRNA با پیش‌آگهی بیماری در ارتباط است. در ارتباط هیپوکسی با بدخیمی (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 پپتید ضدگرایی 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 ضد رگ‌زایی VEGB1 این چرخه، در غلظت  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  برابر با ۲۵/۳ و در گروه تیمار شده با غلظت  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  از پپتید VEGB1 Ct برابر با ۲۷ بود. تفاوت در چرخه آستانه (Ct) نشان‌دهنده تفاوت مقدار بیان ژن 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 ژن مذکور در پاسخ به مقادیر مختلف پپتید تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد. به‌طوری‌که بیان *miR-210* در موش‌های تیمار شده با مقدار  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  از پپتید VEGB1 کاهش معنی‌دار نسبت به گروه دریافت‌کننده مقدار  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  از پپتید داشت ( $p = 0.000$ ). از سوی دیگر مقایسه میزان بیان *miR-210* در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل به روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام شد. بیان *miR-210* در نمونه‌های تحت تیمار به مقدار  $1 \text{ mg}$  از پپتید مهارکننده ۵۸ درصد و در مقدار  $10 \text{ mg}$  از مهارکننده، حدود ۱۰ درصد نسبت به گروه کنترل بود. این نتایج نشان‌دهنده کاهش بیان *miR-210* در نمونه‌های تحت تیمار است. این ارزیابی ۴۲ درصد کاهش بیان *miR-210* در حضور ۱ میلی‌گرم از پپتید VEGB1 را نشان داد در حالی‌که مقدار کاهش بیان در موش‌های دریافت‌کننده ۱۰ میلی‌گرم از پپتید حدود ۹۰ 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 ضد رگ‌زایی آنتاگونیست VEGF موسوم به VEGB1 (Assareh et al., 2019) و تاثیر آن بر بیان *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 آندوتلیال اعمال می‌کند. این گیرنده‌ها از ابرخانواده

برای واسرشت 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 ترموسایکلر 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 ژن *U6* بودند.

### واکنش Real Time PCR

به منظور بررسی بیان ژن *miR-210* واکنش Real-time PCR، با دستگاه Light Cycler 96 انجام شد. حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر Master Premix SYBR Green، ۰/۸ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رو به جلو و برگشتی با غلظت  $5 \text{ pmol/l}$ ، ۱ میکرولیتر (۱۰۰ ng) cDNA و ۷/۴ میکرولیتر آب دیونیزه بود. واکنش تحت شرایط دمایی واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۴۰ سیکل با واسرشت‌سازی 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 50bp (Cinnagen, Iran) با استفاده از ژل آگارز ۲ 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 ژن‌ها با نرم افزار Prism V.6 رسم گردید و همچنین از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه بر حسب fold change محاسبه شد.

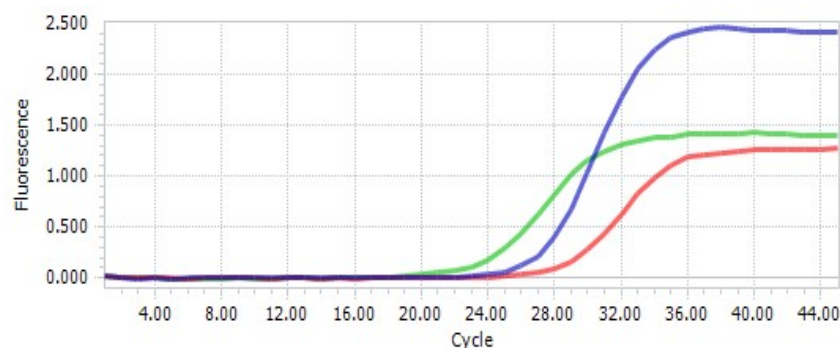
### نتایج

در این تحقیق، برای بررسی تاثیر ضد رگ‌زایی 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) نمونه‌ها برابر با ۱/۹۷ و میانگین غلظت آن‌ها برابر با ۱۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. سنتز cDNA و واکنش Real-time PCR انجام شد. منحنی تکثیر برای بیان *miR-210* در

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

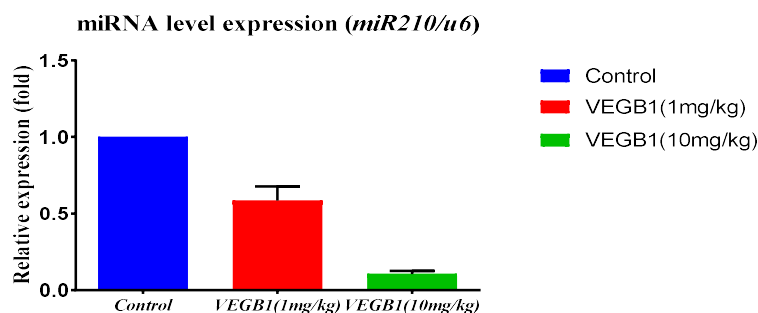
Table 1- Used primers in this study

| Gene           | Primer  | Sequence                     | Tm (°C) |
|----------------|---------|------------------------------|---------|
| <i>miR-210</i> | Forward | 5'-CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA-3' | 67.7    |
|                | Revers  | 5'-GCGTCGACTAGTACAACTCAAG-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  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  از VEGB1. قرمز: تیمار شده با  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  از VEGB1.

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

های فاکتور رشد آندوتلیال عروق نوع ۱ و ۲ به‌طور 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., 2019).

مداخله در مسیرهای سیگنالینگ VEGFs یک استراتژی مهم در مهار رگ‌زایی و متاستاز سلول‌های توموری است. محققین پپتیدهایی با قابلیت اتصال به هر دو گیرنده، VEGFR-1 و VEGFR-2 را

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 پپتیدها و عوارض پایین، و هزینه پایین درمان، می‌توان پپتیدها را به عنوان راهکار بسیار مناسبی برای درمان معرفی کرد (Folkman, 1971, 1990). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که سرکوب گیرنده-

## 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  $\alpha 1$  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-Shahrokhadi, 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., Piazzzi, 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 ( $\alpha$  helix) در VEGF-B به VEGFR-1 و VEGFR-2 متصل شده و با مهار مسیرهای سیگنالینگ PI3/AKT و MAPK/ERK 1/2 از تکثیر و متاستاز القایی توسط VEGF جلوگیری می‌کند. همچنین این پپتید با ممانعت از تشکیل عروق کوچک مانع رشد تومورهای پستانی 4T1 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 ( $p < 0.05$ ) که نشان‌دهنده 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 10 میکروگرم است ( $p = 0.000$ ).

نتایج این تحقیق در مطابقت با نتایج تحقیقات دیگر مبنی بر ارتباط مستقیم *miR-210* و VEGF 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 گیرنده‌های 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 VEGF بستگی دارد (Bavelloni et al., 2017). همچنین نشان داده‌اند که هیپوکسی باعث افزایش بیان VEGF شده و در نتیجه بیان *miR-210* به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Wang et al., 2017). به‌طور 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 میرزائاد (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  $\beta 1$  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., Megwalu, 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 (2<sup>nd</sup> ed.). Elsevier.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, 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., Cail, 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.، طالبش ساسانی، س. و اصغری، س.م. ۱۴۰۰. تأثیر پپتید آنتاگونیست VEGFB بر میزان بیان *miR-210* در سرطان پستان مدل موشی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۱۹-۱۳.