Microgravity effect *on* expression of Raf kinase inhibitor protein on MCF-7 breast cancer cell line

Maryam Salavatifar[1],Zahra Hajebrahimi[2]
1. Assistant Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran, Tel: 021-88366030, Email: salavati@ari.ac.ir, ORCID CD:0000-0003-0745-5967
2. Assistant Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science, Research and Technology, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: The living organisms on the earth are under the influence of natural gravity force and if this gravitational force changes, they will be affected by a unique shock. Weightlessness has important effects on cell function by interfering with biochemical pathways and gene expressions. Study of these changes would be of benefit to astronauts and can improve the quality of human life on earth. In simulated microgravity, the expression of some genes and protein levels produced in cultured cells or laboratory animals have been altered. However, very little information is available on the effects of microgravity on gene expression. Raf kinase inhibitory protein (RKIP) is a regulator of kinase activity and a cell balancing agent that can act as a metastatic inhibitor in a variety of solid tumors, including breast cancer. In general, the RKIP expression in progressive tumors is reduced but its increased expression can result in reduced invasive potency of cancer cells without affecting primary tumor growth.

Materials and Methods: In this study, changes of RKIP gene expression were investigated in human MCF-7 breast cancer cells after 24 and 72 hours exposure to microgravity conditions using qReal time PCR method. We used t-test for data analysis and graphpad prism 7 project for plotting graphs.

Results: The results showed that microgravity changed gene expression of RKIP and led to increased expression levels of the gene after 24 hours exposure to microgravity.

Conclusions: By optimizing the duration of microgravity, we can observe significant changes in RKIP gene expression in MCF-7 cell line which can be considered promising for the treatment of cancer .

Keywords: Clinostat, Gravity, RKIP protein, Tumor
Received:Feb3,2019 Accpt:Oct5,2019

How to cite the article: Maryam Salavatifar,Zahra Hajebrahimi. Microgravity effect *on* expression of Raf kinase inhibitor protein on MCF-7 breast cancer cell line. SJKU 2019; 24 (5): 42-55

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / آذر و دی ۱۳۹۸/۵۵-۴۲

تأثیر بی‌وزنی بر بیان پروتئین مهارکننده کیناز *Raf* در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

مریم صلواتی فر[۱]، زهرا حاج ابراهیمی[۲]

۱ . استادیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۸۸۳۶۶۰۳۰-۰۲۱، Email: salavati@ari.ac.ir، کد ارکید:۵۹۶۷-۰۷۴۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰۰

۲. استادیار، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: موجودات زنده در سطح زمین تحت تأثیر نیروی گرانش طبیعی قرار دارند و چنانچه این نیروی گرانش تغییر نماید، تحت تأثیر شوکی منحصر به فرد قرار خواهند گرفت. بی‌وزنی از طریق مداخله با مسیرهای بیوشیمیایی و بیان ژن، اثرات مهمی را بر عملکرد سلول‌ها دارد و مطالعه این تغییرات برای کمک به فضانوردان و بهبود کیفیت زندگی انسان مفید خواهد بود. هدف از مطالعه؛ تعیین تأثیر بی‌وزنی بر بیان پروتئین مهارکننده کیناز Raf در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان بود.

روش بررسی: در این مطالعه تغییرات بیان ژن *RKIP* در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان انسان بعد از ۲۴ و ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط بی وزنی با روش qReal time PCR بررسی گردید. آزمون t-test برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد و نمودارها توسط برنامه Graphpad prism 7 رسم گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بی وزنی، بیان ژن *RKIP* را تغییر داده و منجر به افزایش سطوح بیان آن پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در شرایط بی‌وزنی گردیده است.

نتیجه‌گیری: با بهینه سازی مدت زمان تیمار بی وزنی شاهد تغییرات قابل توجه در بیان ژن RKIP در رده سلولی MCF-7 خواهیم بود، تا از این طریق بتوان راه‌کارهایی را در درمان سرطان ارائه نمود.

واژگان کلیدی: کلینواستت، جاذبه، پروتئین RKIP، تومور

وصول مقاله:۹۷/۱۱/۱۴ اصلاحیه نهایی:۹۸/۷/۱ پذیرش:۹۸/۷/۱۳

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

مقدمه

سرطان دومین عامل مرگ و میر در سراسر دنیا پس از بیماری‌های قلبی و عروقی بوده و در میان انواع سرطان، سرطان پستان با نرخ سالانه ۱/۲ میلیون مورد جدید، نخستین بدخیمی در میان زنان در سراسر دنیا برشمرده می‌شود(۲و۱). با وجود پایین‌تر بودن میزان ابتلا به این بیماری در ایران به نسبت سایر کشورهای دنیا، به دلیل پیگیری دیر هنگام درمان، آمار مرگ‌ومیر در اثر آن، به مراتب بالاست چرا که تعداد کثیری از مبتلایان زمانی جهت درمان اقدام می‌نمایند که متاستاز رخ داده و سرطان به اندام‌های دیگر منتشر شده است(۳و۱). به دلیل غیر انتخابی بودن شیمی درمانی و پرتو درمانی برای بافت‌ها و سلول‌های درگیر، درصد آسیب به سایر بخش‌ها بالاست. به علاوه بروز مقاومت دارویی، از بزرگ‌ترین موانع در انتخاب نوع درمان‌های شیمیایی محسوب می‌گردد(۵و۴). با توجه به موارد فوق‌الذکر، بررسی راه کارهای جدید احتمالی جهت درمان، قابل توجه خواهند بود.

مهارکننده‌های متاستاز گروهی از ژن‌ها هستند که اگر چنانچه بیش از حد بیان شوند یا بیان مجدد داشته باشند، باعث مهار گسترش سرطان به سایر اندام‌ها، بدون تأثیر بر اندازه تومور اولیه می‌گردند. همانند تشکیل تومور، هم مسیرهای تحریکی و هم مهاری، متاستاز را تنظیم می‌نمایند (۶). پروتئین مهارکننده کیناز Raf (RKIP)، عاملی برای متعادل نمودن فعالیت کیناز بوده و از این رو قادر است شرایط سلول را تنظیم نماید. به علاوه این پروتئین قادر است در انواع تومورها از جمله سرطان پستان و پروستات، به عنوان مهارکننده متاستاز وارد عمل شود. این پروتئین سیتوپلاسمی کوچک، از پروتئین‌های متصل شونده به فسفاتیدیل اتانل آمین است که در اکثر گونه‌های پستانداران از قبیل انسان، موش و میمون به صورت محافظت شده تولید می‌گردد(۹-۷). بیان RKIP در تومورهای پیش رفته کاهش می‌یابد. مطالعات in vitro و in vivo مربوط به بیان RKIP در نمونه‌های سرطان پستان نشان داده که این پروتئین، مراحل متاستاز شامل رگ زایی، تهاجم، ورود به رگ و کلونیزه شدن را محدود می‌نماید و افزایش بیان آن، پتانسیل تهاجمی سلول‌های سرطانی پستان را بدون تأثیر بر رشدشان کاهش داده است(۱۱و۱۰).

کلیه موجودات ساکن بر کره زمین، تحت نیروی جاذبه قرار داشته و با این نیرو تکامل و انطباق یافته‌اند. با مطالعه موجودات و سلول‌ها در شرایط حذف این نیرو، برخی از ابهامات علم زیست شناسی مرتفع شده و حتی می‌توان در ارتقاء کیفیت حیات بر روی زمین و یا حتی ارسال حیات به کرات دیگر، گام‌های مؤثری برداشت(۱۲). یافته‌های پیشین حاکی از آن هستند که با حذف نیروی جاذبه، فرایندهای رشد و تکثیر سلولی و آبشارهای انتقال پیام، دست خوش تغییر گردیده‌اند و شرایط منحصر به فردی ایجاد گشته که از طریق مطالعه آن‌ها، برخی ساز و کارهای سلولی به نحو مطلوب‌تری بررسی و مطالعه گردیده‌اند(۱۴و۱۳). سقوط آزاد و پروازهای فضایی، شرایطی هستند که می‌توان با قرار دادن موجودات و یا سلول‌ها در آن، بی وزنی را اعمال نمود؛ اما بی وزنی رخ داده در سقوط آزاد به دلیل کوتاه بودن، تأثیر قابل توجهی نخواهد داشت. از طرفی پروازهای فضایی نیز محدود و پرهزینه بوده و امکان تکرار آن، بسیار اندک است. با توجه به موارد فوق‌الذکر، ابزارهای شبیه ساز بی وزنی مورد اقبال قرار گرفته و می‌توان جهت مطالعات حذف نیروی جاذبه از آن‌ها استفاده نمود(۱۶و۱۵). با توجه به موارد فوق، مطالعه حاضر به بررسی تأثیر بی‌وزنی شبیه سازی شده بر میزان بیان ژن مهار کننده متاستاز *RKIP* در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان پرداخته است.

روش بررسی

رشد و پاساژ سلولی: رده سلولی MCF-7 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. این رده سلولی مربوط به سرطان پستان بوده که دارای گیرنده‌های استروژن (ER^+)، پروژسترون (PR^+) و فاقد($HER2^-$) HER2 است. این رده سلولی به استروژن حساس بوده و استروژن رسپتور

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

آلفا (ER-α) و استروژن رسپتور بتا (ER-β) را بیان می‌نماید و از این رو به منظور مطالعه مسیر استروژن و توسعه درمان-های سریع الاثر ضد هورمونی مانند تاموکسیفن، رده کارآمدی است(۱۸و۱۷).

سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modification of Eagle medium) تکمیل شده با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) و ۳/۷ گرم در لیتر نمک بی‌کربنات سدیم و ۱ درصد از آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین در فلاسک‌های کوچک کشت سلول کشت داده شدند. سپس فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد CO_2 و ۹۰ درصد رطوبت جهت رشد قرار گرفتند. تمامی مواد ذکر شده جهت کشت از شرکت Gibco, Life Technologies Carlsbad, CA, USA) خریداری شد. پس از این‌که ۸۰-۷۰ درصد کف فلاسک توسط سلول‌ها پر گردید، آن‌ها را از کف جدا نموده و پاساژ سلولی انجام شد. روش پاساژ به این نحو بود که پس از خارج نمودن محیط کشت داخل فلاسک و شستشوی سلول‌ها با محلول PBS، سلول‌ها توسط محلول ۰/۲۵درصد تریپسین-EDTA از کف فلاسک کنده شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. قسمتی از رسوب سلولی به فلاسک‌های جدید انتقال داده شد و مازاد آن پس از افزودن FBS حاوی ۱۰ درصد DMSO (Dimethyl sulfoxide)، در تانک ازت فریز گردید. انکوباسیون فلاسک‌ها در شرایط ذکر شده انجام گردید(۱۹).

القای بی‌وزنی بر سلول‌ها: به منظور القای بی‌وزنی از دستگاه شبیه ساز بی‌وزنی به نام کلینواستت یک محوره که از دفتر سازمان ملل متحد در امور فضای خارج از جو (United Nations Office at Vienna; The Office for Outer Space Affairs)، دریافت شده بود استفاده گردید(شکل ۱). روش کار این دستگاه به این طریق است که با چرخاندن سلول‌ها، قدرت درک جاذبه را از آن‌ها سلب می‌نماید. از این‌رو ابتدا کلینواستت توسط اتانل ۷۵ درصد و اشعه UV استریل شده و داخل انکوباتور کشت سلولی قرار داده شد. پس از شمارش سلولی توسط لام نئوبار، ۲×۱۰^{۶} سلول MCF-7 به درون لوله‌های مخصوص کشت سلول (Tissue culture tube, TPP company, Switzerland) انتقال داده شد. پس از پر شدن حدود ۸۰-۷۰ درصد کف فلاسک توسط سلول‌ها، محیط کشت لوله‌ها خالی شده و با محیطی که به منظور CO_2 دار شدن، از شب قبل درون انکوباتور قرار گرفته بود پر گردید. هدف از پر نمودن لوله‌ها، جلوگیری از حضور حباب و ایجاد نیروهای برشی بر سلول‌ها بود. لوله‌ها در مرکز کلینواستت قرار گرفته و سرعت دستگاه بر روی ۳۰ دور در دقیقه تنظیم شد. در دو آزمون مجزا، لوله‌های کشت کنترل (تحت جاذبه ۱ جی) و لوله‌های کشت اصلی (تحت اثر بی‌وزنی)، به مدت ۱ شبانه روز و ۳ شبانه روز کشت داده شدند(۲۰). برای هر تست سه تکرار در نظر گرفته شد.



شکل۱. دستگاه کلینواستت

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

تخلیص RNA از سلول‌ها: به منظور بررسی برخی تغییرات ژنتیکی حادث شده در سلول‌ها پس از اعمال بی وزنی، از تمامی لوله‌های کنترل و آزمون پس از اتمام زمان‌های ذکر شده، RNA کل جداسازی گردید. جهت تخلیص، محلول RNX-PLUS(سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده به کار رفت. بدین منظور، ابتدا محتوای هر یک از لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از دور ریختن محلول رویی، به میزان ۱ میلی لیتر از محلول RNX-PLUS سرد، به هر لوله افزوده و پس از مخلوط نمودن کامل با سلول‌ها، کل محتوای لوله به میکروتیوب منتقل شده و پس از ورتکس نمودن، در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب افزوده و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، فاز آبی (رویی) به میکروتیوب جدید منتقل شده و با حجم برابر با آن، ایزوپروپانل داخل لوله ریخته شده و به خوبی مخلوط شد. پس از قرار دادن بر روی یخ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شده و ml ۱ اتانل ۷۵ درصد بر روی رسوب ریخته و پس از ورتکسی کوتاه، ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله میکروتیوب‌ها را به حال خود گذاشته تا خشک شوند و سپس میزان ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNase درون هر تیوب ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. غلظت و میزان خلوص RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری سنجیده و کیفیت آن با الکتروفـورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی گردید. RNA های محصول تا انجام مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور حذف آنزیم RNase، کلیه وسایل و مواد به صورت RNase free تهیه گردیدند(۲۱).

ساخت DNA مکمل (Complementary DNA- cDNA) از روی الگوی RNA : RNA استخراج شده از سلول‌ها، حاوی تمام RNA های سلولی از جمله mRNA، tRNA و rRNA می‌باشند. با توجه به ویژگی خاص mRNA در داشتن دنباله poly-A، از آغازگر Oligo-T در ساخت cDNA استفاده می‌گردد. در این مرحله از پروژه از روی RNA استخراج شده از تک‌تک سلول‌ها،DNA مکمل (cDNA) ساخته شد. به این منظور، از کیت سنتز cDNA (Takara, Clontech) استفاده گردید. روش استفاده از این کیت شامل دو مرحله بود به این صورت که ابتدا ۲ میکروگرم RNA جداسازی شده، وارد میکروتیوب گردیده و سپس پرایمر Oligo-dT، بافر مربوطه و آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Reverse Transcriptase) به آن اضافه شدند. در مرحله دوم، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا واکنش متوقف گردد(۲۱).

طراحی پرایمر و تائید آن: طراحی پرایمر برای ژن‌های *GAPDH* (گلیسرآلدهید -۳- فسفات دهیدروژناز) و *RKIP* طبق توالی به دست آمده از پایگاهNCBI توسط نرم افزار۶۴ Gene Runner X انجام شد و اختصاصی بودنشان برای ژن‌های هدف به وسیله برنامه BLAST آزمایش گردید. سپس جهت سنتز به شرکت زیست فناوری پیشگام سفارش داده شد. در این مطالعه ژن *RKIP* به عنوان ژن هدف و *GAPDH* به عنوان ژن مرجع به کار گرفته شد، توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

جدول ۱. آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی سنتز شده جهت PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (جفت باز)
GAPDH F	5'ACGACCACTTTGTCAAGCTCAT3'	۶۷
GAPDH R	5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'	
RKIP F	5'CAATGACATCAGCAGTGGCACAGTC3'	۲۴۹
RKIP R	5'ACATAGTCATCCCACTCGGCCTG3'	

جهت تائید پرایمرها، PCR معمولی به شرح ذیل انجام گردید: مخلوطی با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از PCR master mix 2X (Amplicon)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای بالادست و پایین دست (غلظت ۱۰ pmol/ul)، ۲ میکرولیتر از cDNA الگو مربوطه ساخته‌شده و ۶ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. بعد از آماده‌سازی مخلوط واکنش، درون دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) قرار گرفته و برنامه زیر اجرا گردید: ابتدا واسرشت نمودن اولیه cDNA الگو به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شده و سپس ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و گسترش به مدت ۳۵ ثانیه در ۶۸ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ مرتبه تکرار شد. در پایان کار، گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور تکمیل فرایندها، انجام پذیرفت. دماها جهت مراحل مختلف واکنش PCR، به کمک نرم افزار oligo تخمین زده شد و سپس از طریق آزمون و خطا (انجام واکنش‌های مختلف با دماها متفاوت به صورت PCR گرادیانت) انتخاب گردید.

بررسی بیان ژن *RKIP* با روش Relative quantification Real time PCR (qRT-PCR): سنجش میزان بیان ژن به وسیله دستگاه Real Time PCR (Bio- Step One Plus Rad, USA) با کیت SYBR (Takara, Clontech) premix Ex taqII با روش qReal time PCR به شرح ذیل انجام گردید:

در چاهک پلیت مخصوص Real time PCR مخلوطی با حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر شامل ۱۰ میکرو لیتر مستر میکس سایبرگرین، ۰/۴ میکرو لیتر رنگ ROX، ۱/۶ میکرو لیتر از مخلوط پرایمرهای بالادست و پایین دست (از غلظت ۱۰ pmol/ul هر پرایمر)، ۲ میکرو لیتر از cDNA الگو مربوطه و ۶ میکرو لیتر آب مقطر تهیه شد. پس از آماده سازی تمامی چاهک‌ها، پلیت درون دستگاه Real Time PCR قرار گرفته و دستورالعملی مطابق با برنامه زمانی و دمایی زیر برای آن تعریف شد. ابتدا واسرشت نمودن cDNA الگو به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شده و سپس به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ مرتبه تکرار شد. برنامه شرح داده شده برای هر نمونه cDNA انجام شده و Ct برای هر کدام محاسبه گردید(۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از حداقل دو تکرار مستقل ارائه شده و آزمون t-test برای تجزیه تحلیل آماری انتخاب گردید. از لحاظ آماری، *p-value* کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین نمودارهای مربوطه، با استفاده از برنامه Graphpad prism 7 ترسیم گردید.

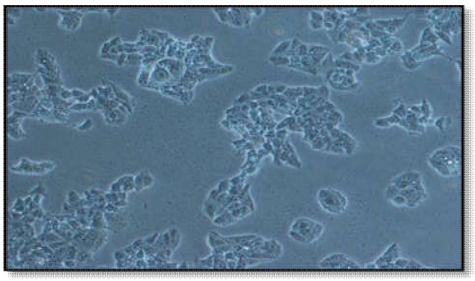
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

شدند. شکل ۲ تصویر این سلول‌ها را در محیط کشت نشان می‌دهد.

یافته‌ها

کشت سلولی پس از تهیه رده سلولی MCF-7، در شرایط کاملاً استریل در محیط کشت DMEM کشت و تکثیر

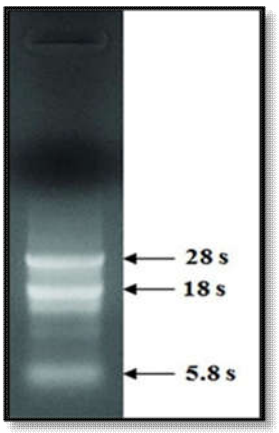


شکل ۲. رده سلولی MCF-7 سرطان پستان

سنجش کمیت و کیفیت RNAهای تخلیص شده: به منظور حصول اطمینان از عدم تجزیه RNA های استحصال شده، غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و کیفیت نمونه‌ها نیز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده و ارزیابی شد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد وجود باندهای S ۲۸، S ۱۸ و S ۵/۸ که شاخص کیفیت RNA است، نشان دهنده استخراج صحیح آن است(شکل ۳). mRNA به صورت اسمیر از بالا تا پایین قابل مشاهده است. نتایج حاصله نشان دهنده این بودند که RNA استحصالی را می‌توان با اطمینان در مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار داد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

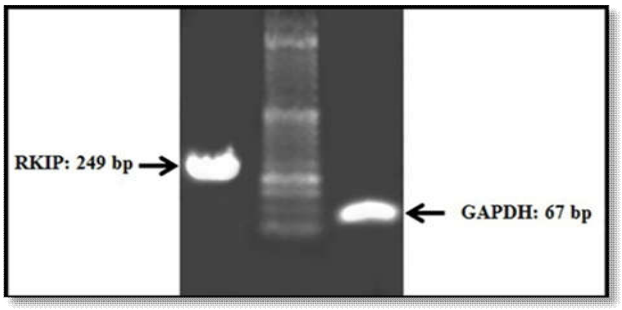
[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]



شکل ۳. بررسی کیفیت RNA کل استحصال شده از سلول‌های MCF-7

عدد ۱/۸ در نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در بررسی با اسپکتروفوتومتر نیز نشان دهنده درجه خلوص بالای نمونه بود. به طور کلی، نتایج نشان دادند که RNA تخلیص شده در مرحله بعدی با اطمینان کامل، قابل کاربرد است.

تائید پرایمرهای ساخته شده: پس از ساختن cDNA، PCR معمولی به منظور تائید پرایمرها انجام شد و نتایج بر ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شدند. حضور دو باند ۶۷ و ۲۴۹ جفت بازی، تائید نمودند که پرایمرها به خوبی به ژن‌های *RKIP* و *GAPDH* متصل شده و تکثیر این دو ژن با موفقیت انجام پذیرفته است(شکل۴).

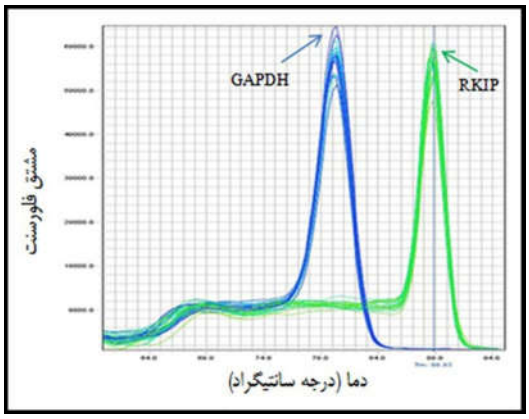


شکل ۴. نتایج تکثیر بخشی از ژن‌های *GAPDH* و *RKIP* ردیف میانی، مارکر مولکولی ۵۰ جفت باز.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

بررسی تغییرات بیانی ژن *RKIP* در سلول‌ها: جهت بررسی میزان بیان ژن مهار کننده متاستاز *RKIP*، واکنش qRT-PCR انجام گردید. در این مطالعه با استناد به پژوهش‌های مشابه بر رده سلولی MCF-7، ژن GAPDH به عنوان یکی از مناسب‌ترین ژن‌ها جهت کنترل داخلی انتخاب گردید، چرا که به صورت دائمی، دارای ثبات بیان ژن حتی در تیمارهای مختلف در رده سلولی مذکور است (۲۳). جهت تائید نمودن صحت قطعات تکثیری و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی، نمودار ذوب (Melting curve) بررسی گردید که وجود تنها یک قله (Peak) در این نوع نمودار برای هر ژن در دمای ذوب ویژه خود، مؤید اختصاصی بودن محصول PCR است(شکل ۵).

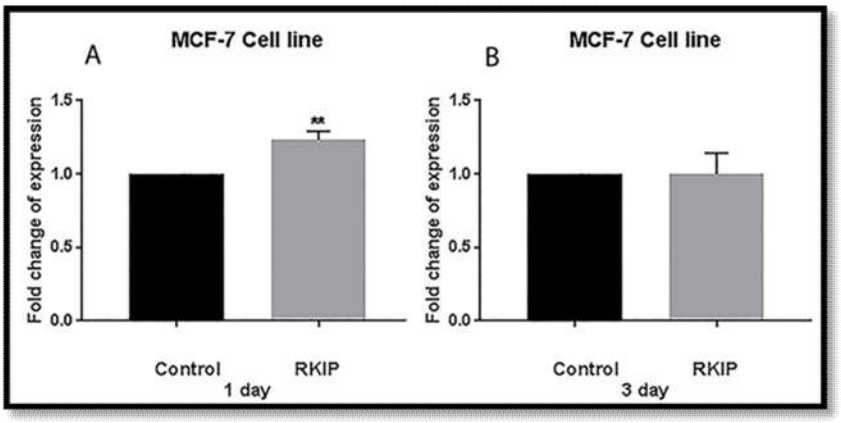


شکل ۵. منحنی‌های ذوب ژن‌های مورد مطالعه در آزمون Real Time PCR برای ژن مرجع *GAPDH* و ژن مورد مطالعه *RKIP*. تنها یک قله در دمای ذوب ویژه برای هر ژن، اختصاصی بودن محصول را ثابت نمود.

بر اساس اطلاعات حاصله از واکنش qRT-PCR، در نمونه‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط نبود جاذبه کشت داده شده بودند، نسبت به نمونه‌های کنترل (شرایط g ۱)، سطح بیان ژن *RKIP* به طور معنی داری افزایش یافته بود ($p <$ ۰/۰۵). با طولانی تر نمودن زمان اعمال بی‌وزنی تا ۷۲ ساعت، بیان ژن هدف کاهش یافته و به سطح کنترل بازگشت(شکل ۶).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]



شکل ۶. تغییرات بیانی ژن *RKIP* نسبت به ژن خانه دار *GAPDH* (کنترل) پس از اعمال بی وزنی ۲۴ ساعت (نمودار سمت چپ) و ۷۲ ساعت (نمودار سمت راست) در واکنش qRT-PCR (**P<0.001).

بحث

در این مطالعه برای نخستین بار به بررسی تغییرات حادث شده بر بیان ژن مهار کننده متاستاز *RKIP* ، در سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان که به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در بی‌وزنی شبیه سازی شده قرار گرفته بودند، پرداختیم چرا که تأثیر حذف جاذبه، هم به صورت شبیه سازی شده و هم واقعی، در مطالعاتی چند بر بیان برخی ژن‌ها و تغییر محتوای بعضی پروتئین‌ها ثابت گردیده است(۲۶-۲۴و۲۰).

سرطان از جمله بیماری‌های مزمن و غیر واگیری است که طیف وسیعی از بیماری‌ها را شامل می‌شود و این بیماری نیز همانند سایر بیماری‌های مزمن، ممکن است در هر فرد با هر سن و هر نژادی رخ داده و از این رو از مهم‌ترین معضلات عمده بهداشت و سلامت در تمامی جوامع در نظر گرفته می‌شود(۲۷). با توجه به آمارهای ارائه شده از گسترش چشمگیر سرطان پستان در زنان و آمار روز افزون فوت در اثر این بیماری و همچنین وقوع متاستاز آن به سایر نقاط بدن، توجه پژوهشگران به راه کارهای نوین در پیش‌آگهی و جلوگیری از مرگ و میر در اثر این بیماری معطوف گردیده است. از عوامل مرتبط با شیب صعودی مبتلایان به این نوع سرطان، می‌توان به داشتن سابقه فامیلی، آلودگی هوا، تغییر الگوی زندگی، عدم فرزند آوری یا به تعویق انداختن آن، استرس، تغییر الگوهای تغذیه‌ای، اضافه وزن اشاره نمود(۲۸). به دلیل هتروژن بودن بالای سرطان پستان و قابلیت متاستاز آن به برخی اندام‌ها، همچنین عدم شفافیت کامل مسیرهای مولکولی درگیر، درک بهتر اساس مولکولی متاستاز و بررسی تأثیرات عوامل مختلف در پیشگیری از وقوع آن، منجر به بهبود و گسترش روش‌های نوین درمانی خواهد گردید.

پروتئین‌های مهارکننده متاستاز گروهی از پروتئین‌های درون‌سلولی هستند که در مراحل مختلف فرایند متاستاز نقش‌آفرینی می‌کنند. شناخت این پروتئین‌ها و فهم چگونگی عملکردشان می‌تواند راه کارهای مهمی را در مورد کنترل فرایند پیچیده متاستاز ارائه دهد(۹و۶). پروتئین RKIP یکی از مهارکننده‌های امید بخش متاستاز است که اعمال فیزیولوژیک مختلفی دارد. در ارتباط با نقش مهار کنندگی متاستاز برای این پروتئین، تحقیقاتی چند انجام پذیرفته است. Zheng و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که این پروتئین در یک مدل زنوگرافت (پیوند از گونه‌ای به گونه دیگر) موشی مربوط به سرطان پروستات، به عنوان مهار کننده متاستاز عمل نموده است(۲۹). علاوه بر این گروه تحقیقاتی Dangi-Garimella در ۲۰۰۹ ثابت نموده‌اند که افزایش بیان پروتئین RKIP از پیشرفت متاستازی مدل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

زنوگرافت سرطان سینه به استخوان ممانعت به عمل آورده است(۱۰). در مطالعه‌ای نشان داده شده که در مدل موشی، برقراری مجدد بیان ژن *RKIP*، برای مهار متاستاز سرطان سینه مؤثر بوده است (۳۰). گروه تحقیقاتی Chatterjee و همکاران نیز نشان دادند که تحریک خارجی برای افزایش بیان RKIP، باعث تحریک آسیب DNA و القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی خواهد شد(۳۱). همچنین ثابت شده است قدرت مهاجرت سلولی و بقای آن در آزمایشگاه با کاهش بیان RKIP افزایش یافته است(۸). با توجه به اهمیت پروتئین RKIP در ممانعت از متاستاز سرطان به سایر اندام‌های بدن، همچنین قابلیت اعمال بی وزنی در تغییرات بیان ژن‌ها، چنانچه بی وزنی قادر به افزایش بیان این پروتئین گردد، افق‌های نوینی را در مبارزه با بیماری کشنده سرطان و ممانعت از متاستاز آن به سایر بافت‌ها خواهد گشود.

موجودات زنده ساکن بر روی کره زمین تحت نیروی گرانشی قرار دارند که از طرف زمین به آن‌ها وارد می‌شود و این نیرو بر روند تکامل و فیزیولوژی موجود و همچنین بر بروز ژن‌ها و عملکرد سلول‌ها تأثیر گذار است(۳۲). با توجه به مشکلات و هزینه‌های بالای مطالعات در شرایط بی وزنی واقعی، دستگاه‌هایی چند برای خنثی‌سازی بی وزنی طراحی شده‌اند که می‌توان به انواع تک محوره (کلینواستت) و سه محوره جهت سلول‌های گیاهی و جانوری و همچنین قفس بی وزنی برای شبیه سازی نبود جاذبه در جوندگان اشاره نمود(۳۳و۳۴). در این پروژه به منظور شبیه سازی بی وزنی، دستگاه کلینواستت تک محوره به کار رفت.

بر اساس تحقیقات انجام پذیرفته توسط Lin و همکاران، بی‌وزنی شبیه سازی شده، خودکشی سلولی را در سلول‌های بنیادی تاج عصب موشی از طریق افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر آپوپتوز، متوقف نموده است(۲۰). در پژوهشی دیگر که توسط گروه تحقیقاتی Aleshcheva انجام پذیرفته مشخص شده است که پس از کشت کندریوسیت‌های انسانی در بی وزنی، بیان ژن و محتوای پروتئینی TGF-β1 افزایش‌یافته است(۲۴). همچنین Nassef و همکاران ، ثابت نمودند که قرار دادن رده سلولی MCF-7 سرطان پستان در شرایط بی وزنی واقعی، بیان بسیاری از ژن-ها دستخوش تغییرات نموده است به نحوی که برخی دچار افزایش و برخی دچار کاهش بیان گردیده و البته برخی بدون تغییر باقی ماندند(۲۵). در یک نگاه کلی، مقاله مروری که توسط Jeanne در سال ۲۰۱۳ تألیف گردیده است به مواردی چند از تغییرات بیان ژن‌ها تحت اعمال بی وزنی اشاره گردیده است(۲۶).

سلول‌های MCF-7 که سطوح پایینی از تهاجم را نشان می-دهند در زیرگروه لومینال قرار داشته و دارای گیرنده استروژن و پروژسترون است و از این رو به درمان‌های هورمونی پاسخ می‌دهند(۳۵). با این حال بسیاری از موارد سرطان پستان مربوط به این منشاء است بنابراین در بخش درمان مورد توجه قرار گرفته است. نتایج به دست آمده از این پروژه نشان دادند که پس از قرار دادن سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌وزنی شبیه سازی شده در قیاس با نمونه‌های کنترل، به طور معنی داری شاهد افزایش بیان ژن مهار کننده متاستاز *RKIP* بودیم. با طولانی تر نمودن مدت زمان بی وزنی شبیه‌سازی‌شده تا ۷۲ ساعت، تغییرات بیان معنی داری نسبت به نمونه‌های کنترل ملاحظه نشد؛ به عبارت دیگر با طولانی نمودن زمان تیمار بی وزنی، سطوح بیان ژن مورد نظر به سطح پایه بازگشت. در حقیقت به منظور تکمیل تحقیقات، دستیابی به نتایج مثبت در رده‌های سلولی سرطانی و برداشتن گام‌های سازنده در پیشگیری از متاستاز سرطان، نیازمند بهینه‌سازی زمان اعمال بی‌وزنی هستیم چرا که مشخص گردید تغییرات بیان ژن *RKIP*، وابسته به الگوی زمانی است.

نتیجه‌گیری

با توجه به آمار رو به رشد سرطان پستان و مرگ و میر در اثر متاستاز آن به سایر اندام‌ها، مقاومت‌های دارویی به انواع درمان‌ها و همچنین اثرات ناخواسته درمان‌ها به سلول‌های سالم بدن، نیاز به روش‌های نوین درمانی در این حیطه کاملاً

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

محسوس است. با استناد به نتایج حاصله به نظر می‌رسد روش حذف جاذبه، روشی مؤثر جهت افزایش بیان ژن مهار کننده متاستاز *RKIP* بوده اما بهینه سازی زمان اعمال این شرایط بر سلول در تحصیل نتایج سازنده، لازم الاجرا است. از این رو امید است با مطالعه بیشتر اثر حذف نیروی جاذبه بر سایر انواع سلول‌ها، ژن‌ها و محصولات آن‌ها بتوان از بی وزنی به عنوان روشی درمانی و پیشگیرانه در مقوله سرطان و متاستاز بهره جست و اطلاعات ارزشمندی را در زمینه رفع ابهامات علوم زیستی به ارمغان آورد.

تشکر و قدردانی

این مقاله در قالب طرح تحقیقاتی به کد PHG-MCF در سال ۱۳۹۷ در پژوهشگاه هوافضا تصویب گردیده و در آزمایشگاه زیست فضایی پژوهشگاه مذکور از محل گرنت پژوهشی انجام گردیده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از مسئولان محترم پژوهشی آن مرکز ابراز می‌دارند.

References

1. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
2. Weiderpass E, Labrèche F. Malignant tumors of the female reproductive system. InOccupational Cancers 2014 (pp. 409-422). Springer, London.
3. Rajaee M, Zare S, Dadipour S, Fallahi S, Rajaee F, Mobarakabadi A, et al. Determining the frequency and causes of maternal mortality in hormozgan province, Iran during 2005-2011. The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility. 2014;16(87):9-14.
4. Sabzichi M, Hamishehkar H, Ramezani F, Sharifi S, Tabasinezhad M, Pirouzpanah M, et al. Luteolin-loaded phytosomes sensitize human breast carcinoma MDA-MB 231 cells to doxorubicin by suppressing Nrf2 mediated signalling. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2014;15(13):5311-6.
5. Willers H, Azzoli CG, Santivasi WL, Xia F. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. Cancer journal (Sudbury, Mass.). 2013 May;19(3):200.
6. Khan I, Steeg PS. Metastasis suppressors: functional pathways. Laboratory Investigation. 2018 Feb;98(2):198.
7. Wottrich S, Kaufhold S, Chrysos E, Zoras O, Baritaki S, Bonavida B. Inverse correlation between the metastasis suppressor RKIP and the metastasis inducer YY1: Contrasting roles in the regulation of chemo/immuno-resistance in cancer. Drug Resistance Updates. 2017 Jan 1;30:28-38.
8. Escara-Wilke J, Yeung K, Keller ET. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in cancer. Cancer and Metastasis Reviews. 2012 Dec 1;31(3-4):615-20.
9. Yesilkanal AE, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein (RKIP) as a metastasis suppressor: regulation of signaling networks in cancer. Critical Reviews™ in Oncogenesis. 2014;19(6).
10. Birner P, Jesch B, Schultheis A, Schoppmann SF. RAF-kinase inhibitor protein (RKIP) downregulation in esophageal cancer and its metastases. Clinical & experimental metastasis. 2012 Aug 1;29(6):551-9.
11. Yousuf S, Duan M, Moen EL, Cross-Knorr S, Brilliant K, Bonavida B, et al. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) blocks signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in breast and prostate cancer. PLoS One. 2014 Mar 21;9(3):e92478.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

12. Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. Breast cancer research and treatment. 2013 Nov 1;142(2):237-55.
13. Yamamoto M, Hosoda M, Nakano K, Jia S, Hatanaka KC, Takakuwa E, et al. p53 accumulation is a strong predictor of recurrence in estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. Cancer science. 2014 Jan;105(1):81-8.
14. Rea G, Cristofaro F, Pani G, Pascucci B, Ghuge SA, Corsetto PA, et al. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment. Journal of proteomics. 2016 Mar 30;137:3-18.
15. Versari S, Longinotti G, Barenghi L, Maier JA, Bradamante S. The challenging environment on board the International Space Station affects endothelial cell function by triggering oxidative stress through thioredoxin interacting protein overexpression: the ESA-SPHINX experiment. The FASEB Journal. 2013 Nov;27(11):4466-75.
16. Maier JA, Cialdai F, Monici M, Morbidelli L. The impact of microgravity and hypergravity on endothelial cells. BioMed research international. 2015;2015.
17. Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen PC, de Geest M, et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. Astrobiology. 2013 Jan 1;13(1):1-7.
18. Dadgarnia H, Hajebrahimi Z. The Effect of Microgravity Condition on Expression of VEGFR-2 Gene in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Journal of Arak University of Medical Sciences. 2016 May 10;19(2):26-34.
19. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons; 2015 Dec 23.
20. Lin SC, Gou GH, Hsia CW, Ho CW, Huang KL, Wu YF, et al. Simulated microgravity disrupts cytoskeleton organization and increases apoptosis of rat neural crest stem cells via upregulating CXCR4 expression and RhoA-ROCK1-p38 MAPK-p53 signaling. Stem cells and development. 2016 Jun 6;25(15):1172-93.
21. Hassanzadeh K, Nikzaban M, Moloudi MR, Izadpanah E. Effect of selegiline on neural stem cells differentiation: a possible role for neurotrophic factors. Iranian journal of basic medical sciences. 2015 Jun;18(6):549.
22. Jensen EC. Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction to Measure mRNA: Use, Limitations, and Presentation of Results. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. 2012 Jan;295(1):1-3.
23. Liu LL, Zhao H, Ma TF, Ge F, Chen CS, Zhang YP. Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. PloS one. 2015 Jan 24;10(1):e0117058.
24. Aleshcheva G, Sahana J, Ma X, Hauslage J, Hemmersbach R, Egli M, et al. Changes in morphology, gene expression and protein content in chondrocytes cultured on a random positioning machine. PLoS One. 2013 Nov 11;8(11):e79057.
25. Nassef MZ, Kopp S, Wehland M, Melnik D, Sahana J, Krüger M, et al. Real Microgravity Influences the Cytoskeleton and Focal Adhesions in Human Breast Cancer Cells. International journal of molecular sciences. 2019 Jan;20(13):3156.
26. Becker JL, Souza GR. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. Nature Reviews Cancer. 2013 May;13(5):315.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]

27. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA: a cancer journal for clinicians. 2011 Jul;61(4):212-36.
28. Onsory K, Ranapoor S. Breast cancer and the effect of environmental factors involved. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2011 Oct 15;1(4):59-70.
29. Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. Journal of the National Cancer Institute. 2003 Jun 18;95(12):878-89.
30. Beshir AB, Ren G, Magpusao AN, Barone LM, Yeung KC, Fenteany G. Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor-κB-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression. Cancer letters. 2010 Dec 28;299(2):137-49.
31. Chatterjee D, Yuan Z, Bonavida B, Darnowski J, Chin YE. RKIP inhibits IL-6-mediated activation of Stat 3 in DU145 prostate cancer cells.
32. Winnard A, Nasser M, Debuse D, Stokes M, Evetts S, Wilkinson M, et al. Systematic review of countermeasures to minimise physiological changes and risk of injury to the lumbopelvic area following long-term microgravity. Musculoskeletal Science and Practice. 2017 Jan 1;27:S5-14.
33. Jamon M. The development of vestibular system and related functions in mammals: impact of gravity. Frontiers in integrative neuroscience. 2014 Feb 7;8:11.
34. Aleshcheva G, Bauer J, Hemmersbach R, Egli M, Wehland M, Grimm D. Tissue engineering of cartilage on ground-based facilities. Microgravity science and technology. 2016 Jun 1;28(3):237-45.
35. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast cancer research. 2011 Aug;13(4):215.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.5.42]