

اثرات ضد سرطانی تیمار ترکیبی تراستوزوماب و الیگودنوئوسی نوکلئوتیدهای تله برای هدف قرار دادن فاکتور رونویسی STAT3 بر روی رده سلولی سرطانی پستان SK-BR-3

بهروز جوهری^۱ (Ph.D)، رقیه قربانی^{۱*} (M.Sc)، سارا حیدری^۱ (M.Sc)، سمیه رشیدی^۱ (M.Sc)، حمید معدنچی^{۲*} (Ph.D)

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۴-۳۳۱۴۰۲۲۵، ۰۲۱-۳۳۶۵۴۱۸۷، ۰۲۴-۳۳۱۴۰۲۲۵، roghayeh.ghorbani@yahoo.com-hamidmadanchi@yahoo.com تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۹

چکیده

هدف: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان و عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از آن است. جراحی، شیمی‌درمانی، اشعه‌درمانی و مونوکلونال آنتی‌بادی (تراستوزوماب) درمانی، روش‌های درمانی مرسوم و استاندارد برای این سرطان هستند. با این حال، محدودیت‌های قابل توجهی در درمان این بیماری با استفاده از روش‌های فوق‌الذکر وجود دارد. با توجه به نقش فاکتورهای رونویسی در بیان ژن‌ها، تمایز درمانی و بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی سرطان، در تحقیق حاضر اثر تیمار ترکیبی تراستوزوماب (هرسپتین) و الیگودنوئوسی نوکلئوتیدهای تله برای هدف قرار دادن فاکتور رونویسی STAT3 بر مهار رشد رده سلولی HER2 مثبت SK-BR-3 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در ابتدا غلظت‌های مختلفی از ۰/۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از تراستوزوماب (Trastuzumab) تهیه شد. الیگودنوئوسی نوکلئوتیدهای تله (Decoy) و اسکرامبل (Scramble) برای هدف قرار دادن فاکتور رونویسی STAT3 طراحی و سنتز شدند. کارایی ترانسفکشن و اثرات ترکیبی تراستوزوماب به همراه الیگوهای تله بر میزان زنده‌مانی سلولی، آپوپتوز و مهارت سلولی ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که الیگودنوئوسی نوکلئوتیدهای تله نشان‌دار شده با فلوروفور Cy3 (۳۰۰ نانومولار)، با کارایی بالا (۸۱/۷±۶/۹٪) وارد سلول‌ها می‌شوند. تیمار ترکیبی سلول‌ها با تراستوزوماب (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به همراه الیگودنوئوسی نوکلئوتیدهای تله (۱۰۰ نانومولار) منجر به کاهش زنده‌مانی سلولی (۵۸/۸۶±۲/۷۱٪)، افزایش آپوپتوز (۲۴/۵۴±۴/۸۳٪) و مهارت سلولی (۴۵/۹۵±۴/۲۱٪) شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، اثرات ضد سرطانی درمان ترکیبی با استفاده از تراستوزوماب به همراه الیگودنوئوسی نوکلئوتیدهای تله برای هدف قرار دادن فاکتور رونویسی STAT3 را در سلول‌های SK-BR-3 تأیید می‌کنند؛ بنابراین به نظر می‌رسد این استراتژی می‌تواند به عنوان یک ابزار کمکی در کنار سایر درمان‌های رایج برای سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، گیرنده HER2، الیگودنوئوسی نوکلئوتید تله، فاکتور رونویسی STAT3، آپوپتوز، مهارت سلولی

مقدمه

است. داروهای شیمی‌درمانی به طور غیراختصاصی در بدن توزیع می‌شوند و در طول درمان مستعد ابتلا به مقاومت چند دارویی (Multiple drug resistance-MDR) هستند [۴،۳]. کارایی اشعه‌درمانی نیز به دلیل عوارض جانبی آن محدود شده است [۵]. استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal antibodies-mAbs) برای درمان مولکولی هدفمند یکی از روش‌های موفق برای بیماران سرطانی است، ولی تجویز آن خطر واکنش‌های ایمنی مانند آنافیلاکسی حاد، بیماری‌های

سرطان پستان در زنان شایع‌ترین سرطان و عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از آن است [۱]. استراتژی‌های درمانی سرطان پستان شامل جراحی، اشعه‌درمانی (Radiotherapy)، شیمی‌درمانی (Chemotherapy)، اندوکراین (هورمون) درمانی (Endocrine therapy) و درمان‌های هدفمند مانند «تمایز درمانی» است [۲]. در حال حاضر انواع روش‌های درمانی تومورها غیراختصاصی و با محدودیت‌های قابل توجهی همراه

برون تن (in vitro) و درون تن (in vivo) رابطه بین سطوح بالای بیان HER2 و بدخیمی سرطان پستان در مراحل اولیه، متاستاز و کاهش کارایی هورمون درمانی را نشان داده‌اند [۲۲،۲۱]. تراستوزوماب (که با نام تجاری هرستپتین شناخته می‌شود) یک مونوکلونال آنتی‌بادی انسانی نوترکیب است که قادر به اتصال به گیرنده HER2 و مسدود کردن آن بوده و برای درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان با بیان بالای HER2 تأیید شده است. استفاده ترکیبی از تراستوزوماب به همراه شیمی‌درمانی می‌تواند نتایج بهتری را در بهبود بقای بدون پیشرفت سرطان در بیماران HER2 مثبت ارائه دهد [۲۳،۲۴].

مسیرهای پیام‌رسانی مانند JAK/STAT3 و HER2 نقش مهمی در بدخیمی و مقاومت دارویی تومورها دارند و هدف قرار دادن این مسیرها در سلول‌های توموری مانند SK-BR-3 که HER2 مثبت بوده و بیان بالایی از STAT3 را نشان می‌دهند [۲۵] می‌تواند روش کمک درمانی مؤثری باشد. مهارکننده‌های مولکولی کوچکی که بتوانند STAT3 را هدف قرار دهند، برای درمان سرطان پستان کارآمد هستند [۱۲]. در راستای این امر، تله‌های الیگودنوکیسی نوکلئوتیدی فاکتور رونویسی (Transcription factor decoys-TFDs) به عنوان یک کلاس جدید از داروهای مبتنی بر الیگودنوکیسی نوکلئوتید در مقایسه با سایر فناوری‌های خاموش‌کننده ژن مبتنی بر DNA یا RNA (الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس یا RNAهای مداخله‌گر کوچک) می‌توانند برای مهار هم‌زمان چندین ژن درگیر در مسیرهای خاص در مرحله قبل از رونویسی طراحی شوند [۹]. فاکتورهای رونویسی توالی اتصال کوتاهی را در ناحیه پروموتری DNA ی ژنومی شناسایی کرده و به آن متصل می‌شوند؛ بنابراین با سنتز مصنوعی این توالی‌های کوتاه الیگودنوکیسی نوکلئوتیدی و وارد کردن آن‌ها به داخل سلول می‌توان از اتصال فاکتور رونویسی به توالی پروموتور جلوگیری کرده و از این طریق بیان ژن‌های پایین دست آن را در مرحله پیش از رونویسی مهار نمود [۲۷،۲۶]. تا به امروز از روش الیگودنوکیسی نوکلئوتیدهای تله برای مهار فاکتورهای رونویسی مختلف از جمله CREB, NF-kB, AP-1, E2F, STAT3, P53, Tax, TAR/tat, HIF استفاده شده است [۲۸]. در مطالعات قبلی ما از این استراتژی برای مهار فاکتورهای رونویسی نظیر c-Myc, Sox2, Oct4, STAT3 و Nanog در سلول‌های مختلفی استفاده شده و نتایج با اهمیتی به دست آمده است [۲۹-۳۲]. در سال ۲۰۱۲، کارایی و ایمنی توالی‌های الیگودنوکیسی نوکلئوتید تله ی STAT3 در مرحله کارآزمایی بالینی با روش تزریق تک‌دوز

خود ایمنی، بیماری سرمی و تولید آنتی‌بادی‌ها را به همراه دارد [۷،۶]؛ بنابراین برای غلبه بر این محدودیت‌ها و دستیابی به کارایی بهتر در درمان سرطان، ترکیب روش‌های جدید درمانی با روش‌های رایج درمانی نظیر شیمی‌درمانی، اشعه‌درمانی و مونوکلونال آنتی‌بادی درمانی ضروری است. در این رابطه استفاده از روش‌های نوین و هدفمند، مانند تمایز درمانی می‌تواند نقش مفیدی در افزایش کارایی درمان‌های ضد سرطانی داشته باشد.

در استراتژی تمایز درمانی (Differentiation therapy) از مواد شیمیایی و الیگونوکلئوتیدها برای تمایز سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود تا سلول از چرخه سلولی خارج شده و تکثیر آن متوقف گردد [۸]. از آن‌جا که تغییر در بیان ژن‌ها نقش اصلی را در پاتوژنز بیماری‌ها ایفا می‌کند، لذا فاکتورهای رونویسی (Transcription factors-TFs) و دیگر تنظیم‌کننده‌های بیان ژن می‌توانند به عنوان هدف دارویی به منظور تداخل‌های درمانی در نظر گرفته شوند [۹]. چندین فاکتور رونویسی به طور مستقیم در ایجاد و پیشرفت سرطان پستان نقش دارند. یکی از شاخص‌ترین خانواده‌های فاکتور رونویسی در سرطان پستان، مبدل‌های سیگنال و فعال‌کننده‌های خانواده رونویسی (Signal transducer and activator of transcription -STAT) است [۱۰]. پتانسیل چندوجهی STAT3 به عنوان یک فاکتور رونویسی انکوژنیک به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۱-۱۳]. مطالعات بالینی و پیش بالینی اخیر نقش STAT3 بیش از حد بیان شده را در پیشرفت، تکثیر، متاستاز و مقاومت شیمیایی سرطان پستان نشان داده است [۱۲]. STAT3 از طریق چندین سایتوکین، از جمله اینترلوکین ۶ (IL-6) و اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و فاکتورهای رشد، از جمله فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) و فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) فعال می‌شود [۱۴،۱۵].

هم‌چنین در طول دهه‌های گذشته، مسیر پیام‌رسانی Human epidermal growth factor receptor (HER2) در سلول‌های سرطان پستان HER2 مثبت تحت مطالعات زیادی برای اکتشاف و یا بهبود استراتژی‌های درمانی سرطان پستان قرار گرفته‌اند [۱۶]. HER2 یک گیرنده تیروزین کینازی و عضوی از خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) است که باعث فعال شدن مسیرهای پیام‌رسان Protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/AKT) و Mitogen-activated protein kinase (MAPK) می‌شود [۱۷-۱۹]. فعال شدن این سیگنال منجر به رشد، مهاجرت، تکثیر، بقا و رگزی می‌شود [۲۰]. طیف گسترده‌ای از مطالعات

برای سنتز به شرکت سوئیسی MicroSYnth ارسال گردید. در پایان برای بررسی فلوسایتومتری میزان کارایی ورود الیگوهای تله بعد از ترانسفکشن به داخل سلول‌ها، انتهای ۳' هر رشته را با Cy3 نشان‌دار کردیم.

در توالی‌های مربوط به الیگوهای DEC و SCR، جایگاه اتصال اصلی، تغییرات فسفورو تیوئید در ۳' و ۵' و جهش‌های ایجاد شده به ترتیب با حالت نوکلئوتیدهای پررنگ، نوکلئوتیدهای ستاره‌دار و نوکلئوتیدهای ایتالیک/زیرخط نشان داده شده‌اند.

توالی الیگوهای تله:

F [5'G*AAGGCTTCCAGGAAAAGACT*G3']
R [5'C*TTCCGAAGGTCCTTTTCTGA*C3']

توالی الیگوهای اسکرامل:

F [5'G*AAGGCTTGCACGTAAGACT*G3']
R [5'C*TTCCGAACGTGCATTTCTGA*C3']

سنجش کارایی ترانسفکشن الیگودنوکی نوکلئوتیدها (ODNs). از لیپوفکتامین (Lipofectamine® 2000; Invitrogen) به عنوان حاملی برای انتقال الیگوها به سلول استفاده شد [۳۵]. سلول‌های SK-BR-3 با تراکم $10^4 \times 5$ سلول به ازای هر چاهک در پلیت ۲۴ چاهکی (SPL, Korea) به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محیط کامل کشت داده شد. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۶۰-۷۰٪ کف پلیت، محیط کشت رویی دور ریخته و سلول‌ها با PBS استریل شسته شدند. به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول الیگوهای نشان‌دار شده با Cy3 (با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نانومولار) و ۵۰ میکرولیتر از لیپوفکتامین (۱۰۰ میکرولیتر حجم نهایی حاصل از ترکیب هر دو) با هم مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود کشت سلول و دمای اتاق انکوبه و سپس به چاهک‌ها منتقل شدند. یک گروه سلولی نیز بدون هیچ تیماری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵٪، سلول‌های ترانسفکت شده توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD Biosciences, San Jose, CA) خوانش و نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار FlowJo v.7.6.1 تحلیل و گزارش شدند. این سنجش برای هر گروه ۳ مرتبه تکرار و توسط نرم‌افزار Graphpad Prism 8 میانگین و SD نتایج محاسبه شده و منحنی‌های مربوطه رسم گردید.

سنجش سمیت سلولی. میزان سمیت سلولی الیگوهای تله و اسکرامل، تراستوزوماب و نیز در حالت ترکیبی علیه سلول‌های SK-BR-3 با روش MTT (دی‌متیل تiazول دی‌فنیل تترازولیم بروماید) در ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت [۳۶]. سلول‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم

درون توموری به سلول‌های کارسینومای اسکواموزای سر و گردن مورد ارزیابی قرار گرفت [۳۳].

در مطالعه حاضر، بررسی اثرات ضد سرطانی تیمار ترکیبی تراستوزوماب به همراه الیگودنوکی نوکلئوتیدهای تله برای هدف قرار دادن فاکتور رونویسی STAT3 بر روی رده سلولی سرطانی پستان HER2 مثبت SK-BR-3 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد. ماده MTT، کیت Annexin V-FITC (Biolegend)، پرویدوم یدید (Sigma-Aldrich)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، سرم جنین گاوی (FBS) و تریپسین-EDTA از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا) تهیه شد. تراستوزوماب (هرسپتین) از شرکت Roche (سوئیس) و محیط کشت DMEM از شرکت Gibco (اسکاتلند) خریداری شد. دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، متانول و استون از شرکت Emertat (ایران) و رده سلولی SK-BR-3 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. کشت سلولی. رده سلولی سرطان پستان انسان SK-BR-3 در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا (Gibco, Carlsbad, CA)، سرم جنین گاوی ده درصد (Gibco)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شده و در انکوباتور با رطوبت ۹۵٪، CO_2 ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

طراحی و سنتز الیگوهای تله و اسکرامل برای فاکتور رونویسی STAT3. طراحی توالی الیگودنوکی نوکلئوتیدهای تله (DEC) با طول ۲۲ نوکلئوتید برای فاکتور رونویسی STAT3 از طریق تارنمای Cistrome Data Browser و بر اساس توالی حفاظت شده جایگاه اتصال این فاکتور در ژن Bcl-xL صورت گرفت [۳۴، ۳۱]. برای طراحی توالی اسکرامل (SCR) اقدام به ایجاد جهش در سه نوکلئوتید از توالی جایگاه اتصال اصلی مربوط به فاکتور رونویسی STAT3 شد. بررسی نرم‌افزاری (in silico) توانایی اتصال توالی تله به فاکتور رونویسی STAT3 با استفاده از تارنمای tfbind.hgc.jp به صورت آنلاین انجام گرفت که بر پایه TRANSFAC® database برنامه‌ریزی و طراحی شده است. همچنین برای جلوگیری از تخریب نوکلئازی توالی‌های دو رشته‌ای تله و اسکرامل طراحی شده در شرایط داخل سلولی به تعداد یک نوکلئوتید از هر دو انتهای ۳' و ۵' فسفورو تیوئید (Phosphorothioate) شد که در این حالت سولفور جایگزین اکسیژن آزاد در گروه فسفات موجود در دنوکسی نوکلئوتید می‌شود. در نهایت الیگوهای طراحی شده

ارزیابی شد [۳۱]. سلول‌ها با تراکم 5×10^4 سلول به ازای هر چاهک در پلیت ۱۲ چاهکی (SPL, Korea) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، در تراکم سلولی حدود ۷۰٪، خراش بر لایه سلولی با استفاده از نوک تیپ استریل ۲۰۰ میکرولیتری ایجاد شد. سلول‌های گروه‌های مختلف به ترتیب با ۱۰۰ نانومولار الیگوهای تله، ۱۰۰ نانومولار الیگوهای اسکرامبل، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تراستوزوماب و ترکیبی از ۱۰۰ نانومولار الیگوهای تله و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تراستوزوماب تحت تیمار قرار گرفتند. یک گروه نیز بدون هیچ تیماری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. فرایند بسته شدن شکاف با استفاده از میکروسکوپ Nikon (ECLIPSE TS2, Tokyo, Japan) در زمان‌های صفر و ۴۸ ساعت عکس‌برداری شد. میانگین درصد مهار مهاجرت سلولی بعد از آنالیز با نرم‌افزار ImageJ (v1.52; NIH) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Migration inhibition (\%)} = [At=0h / At=h] \times 100\%$$

At=0h (gap size in 0 hour): is the area of the wound measured immediately after scratching

At= h (gape size in ultimate hour): is the area of the wound measured h hours after the scratch is performed

روش‌های آماری. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism 8.0 انجام و به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) بیان شد. معنی‌داری با استفاده از آنالیز واریانس برای گروه‌های متعدد (بیش از ۲) محاسبه شد. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. (*), $P < 0.05$, (**), $P < 0.01$, (***) و $P < 0.001$ (****) تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد.

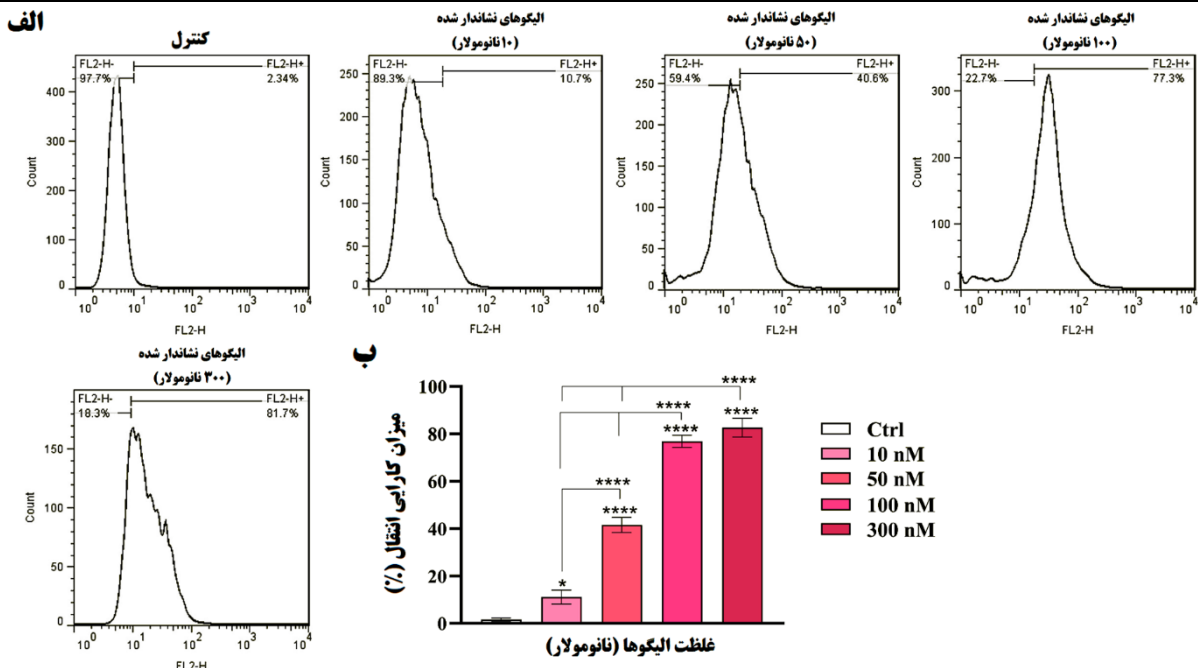
نتایج

ترانسفکشن الیگودنوکی نوکلئوتیدهای نشان‌دار شده با Cy3 با کارایی بالایی انجام گرفت. میزان ترانسفکشن در تمام گروه‌های سلولی تیمار شده با الیگوهای نشان‌دار شده نسبت به گروه کنترل معنادار بود (غلظت ۱۰ نانومولار با $P < 0.05$ و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نانومولار با $P < 0.0001$ معنی‌دار بودند). بیش‌ترین میزان ترانسفکشن در سلول‌های SK-BR-3 در غلظت ۳۰۰ نانومولار از الیگوهای تله اتفاق افتاد که این میزان $81.7 \pm 6.9\%$ بود. میزان کارایی ترانسفکشن در غلظت ۳۰۰ نانومولار در مقایسه با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ نانومولار معنادار بود ($P < 0.0001$) ولی نسبت به ۱۰۰ نانومولار معنادار نبود (شکل ۱).

سلولی 1×10^4 به ازای هر چاهک به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کامل کشت داده شد. برای انجام این آزمون در ابتدا غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ نانومولار از الیگوهای تله و اسکرامبل و نیز غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تراستوزوماب (Tz) تهیه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های فوق‌الذکر از الیگوهای تله و اسکرامبل، تراستوزوماب و نیز ترکیبی از الیگوهای تله و تراستوزوماب (DEC+Tz) تحت تیمار در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. یک گروه نیز بدون هیچ تیماری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵mg/mL) به هر چاهک اضافه شده و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 محلول DMSO با حذف محلول MTT به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت، جذب توسط الیزا ریدر (ELISA Reader) در طول موج ۶۳۰/۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این سنجش برای هر گروه ۳ مرتبه تکرار و توسط نرم‌افزار Graphpad Prism میانگین و SD نتایج محاسبه شده و منحنی‌های مربوطه رسم گردید.

سنجش آپوپتوز سلولی. میزان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی الیگوهای تله و اسکرامبل، تراستوزوماب و نیز در حالت ترکیبی علیه سلول‌های SK-BR-3 با روش Annexin V-FITC/PI در ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت [۳۷]. ابتدا به ازای هر چاهک از پلیت ۱۲ چاهکی تعداد 7×10^4 سلول به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محیط کامل اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌ها تحت تیمار با الیگوهای تله و اسکرامبل با غلظت ۱۰۰ نانومولار، تراستوزوماب با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نیز ترکیبی از الیگوهای تله (۱۰۰ نانومولار) و تراستوزوماب (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. یک گروه نیز بدون هیچ تیماری به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس رنگ‌آمیزی رسوب سلولی با ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال Annexin V حاوی Annexin V-FITC و پرویديوم یدید (PI) طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. خوانش نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتمتری (BD Biosciences, San Jose, CA) و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار FlowJo v.7 انجام شد. این سنجش برای هر گروه ۳ مرتبه تکرار و توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 8 میانگین و SD نتایج محاسبه شده و منحنی‌های مربوطه رسم گردید.

سنجش ترمیم زخم (خراش). بررسی مهار مهاجرت سلولی با استفاده از روش ترمیم خراش (Scratch) در ۵ گروه



شکل ۱. الف) میزان کارایی انتقال توالی‌های الیگودنوکی نوکلئوتیدی به سلول‌های SK-BR-3. ب) نمودار آماری حاصل از آنالیز نتایج از آزمون One-way ANOVA. [P<0.05 (*), P<0.0001(****)].

گروه‌های سلولی تیمار شده با ۱۰۰ نانومولار از الیگوهای تله و (P<0.001) و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تراستوزوماب و همچنین گروه تیمار شده با ترکیبی از الیگوهای تله و تراستوزوماب [DEC (۱۰۰nM) + Tz (۱۰ μg/mL)] (P<0.0001) در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافته است. میزان آپوپتوز ایجاد شده در گروه تیمار با تراستوزوماب تفاوت معناداری با گروه تیمار شده با الیگوهای تله نداشت. سلول‌های تیمار شده با DEC+Tz میزان آپوپتوز سلولی بیشتری را در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان داد که تأییدکننده اثر هم‌افزایی حاصل از تیمار ترکیبی تله‌ی STAT3 و آنتی‌بادی تراستوزوماب می‌باشد (شکل ۳).

میزان مهاجرت سلولی بعد از ترانسفکشن با الیگوهای تله و تراستوزوماب کاهش یافت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که سلول‌های تیمار شده با الیگوهای تله (۱۰۰ نانومولار)، تراستوزوماب (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ترکیبی از الیگوهای تله و تراستوزوماب [DEC (۱۰۰nM) + Tz (۱۰ μg/mL)] در مقایسه با گروه اسکرامبل و کنترل توانایی مهاجرت کم‌تر و در نتیجه نیاز به زمان بیشتری برای پر کردن شکاف ایجاد شده دارند [به ترتیب (***) (P<0.001) و (***) (P<0.001) هم‌چنین میزان مهار مهاجرت سلولی در گروه تیمار شده با الیگوهای تله بیش‌تر از گروه اسکرامبل بود که نشان‌دهنده عملکرد هدفمند الیگوهای تله در مهار فاکتور رونویسی STAT3 است (***)]. میزان درصد مهار مهاجرت سلولی در گروه‌های تیمار شده با الیگوهای تله و تراستوزوماب تفاوت معنی‌داری

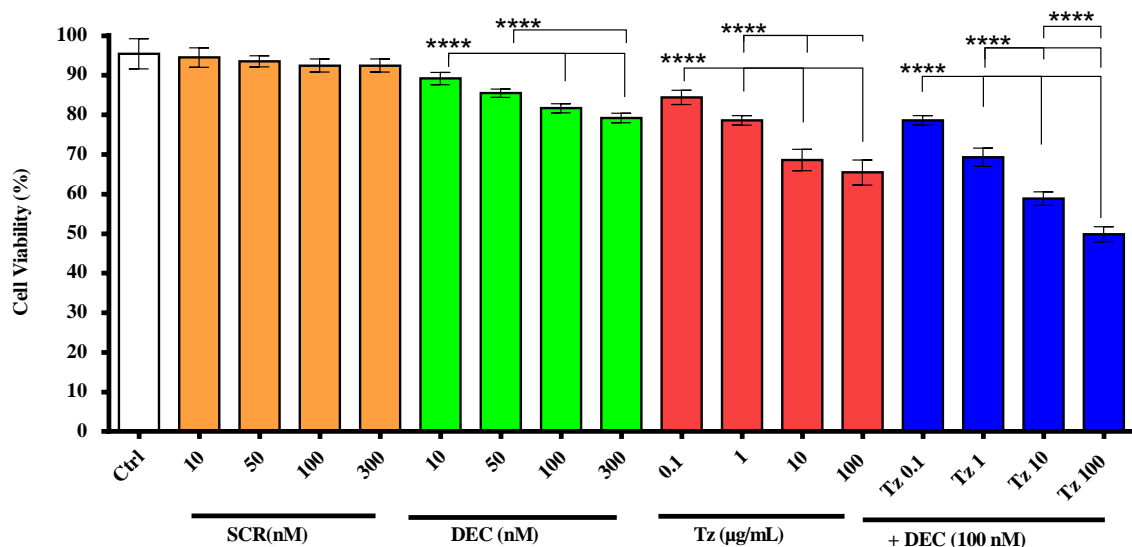
زنده‌مانی سلول‌های SK-BR-3 بعد از ترانسفکشن با الیگوهای تله و تراستوزوماب کاهش یافت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که الیگوهای تله در همه غلظت‌های مورد مطالعه اثر مهار معناداری بر رشد سلول‌های SK-BR-3 در مقایسه با گروه کنترل دارد، این در حالی است که ترانسفکشن الیگوهای اسکرامبل هیچ اثر مهار معناداری بر رشد این سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل نداشت. تیمار سلول‌ها با گروه‌های مختلف آزمایشی نظیر الیگوهای تله، تراستوزوماب و ترکیبی از الیگوهای تله و تراستوزوماب در هر چهار غلظت استفاده شده در مقایسه با گروه کنترل بعد از گذشت ۲۴ ساعت باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها به صورت وابسته به مقدار (Dose) می‌شود.

میزان زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تراستوزوماب به همراه ۱۰۰ نانومولار الیگوی تله کاهش بیش‌تر زنده‌مانی را در مقایسه با گروه‌های دیگر نشان داد. روی هم رفته می‌توان نتیجه گرفت که اثرات مهار الیگوهای تله و آنتی‌بادی تراستوزوماب بر روی رشد سلول‌ها وابسته به مقدار می‌باشد و با افزایش مقدار دارو، میزان زنده‌مانی سلولی کاهش می‌یابد. هم‌چنین تیمار ترکیبی الیگوهای تله و تراستوزوماب بر کاهش زنده‌مانی رده‌ی سلولی HER2 مثبت سرطان پستان اثر هم‌افزایی داشته است (شکل ۲).

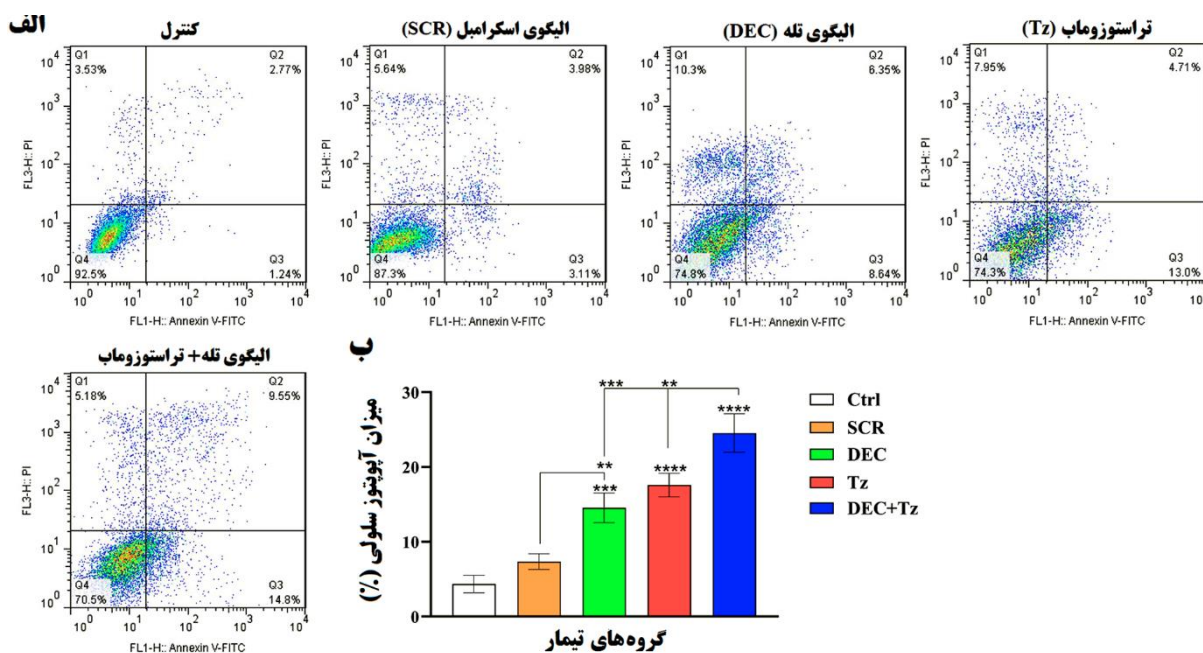
میزان آپوپتوز سلولی بعد از ترانسفکشن با الیگوهای تله و تراستوزوماب افزایش یافت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی در

بود و این نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی ترکیب الیگوهای تله و تراستوزوماب در مهار مهاجرت سلولی است (شکل ۴).

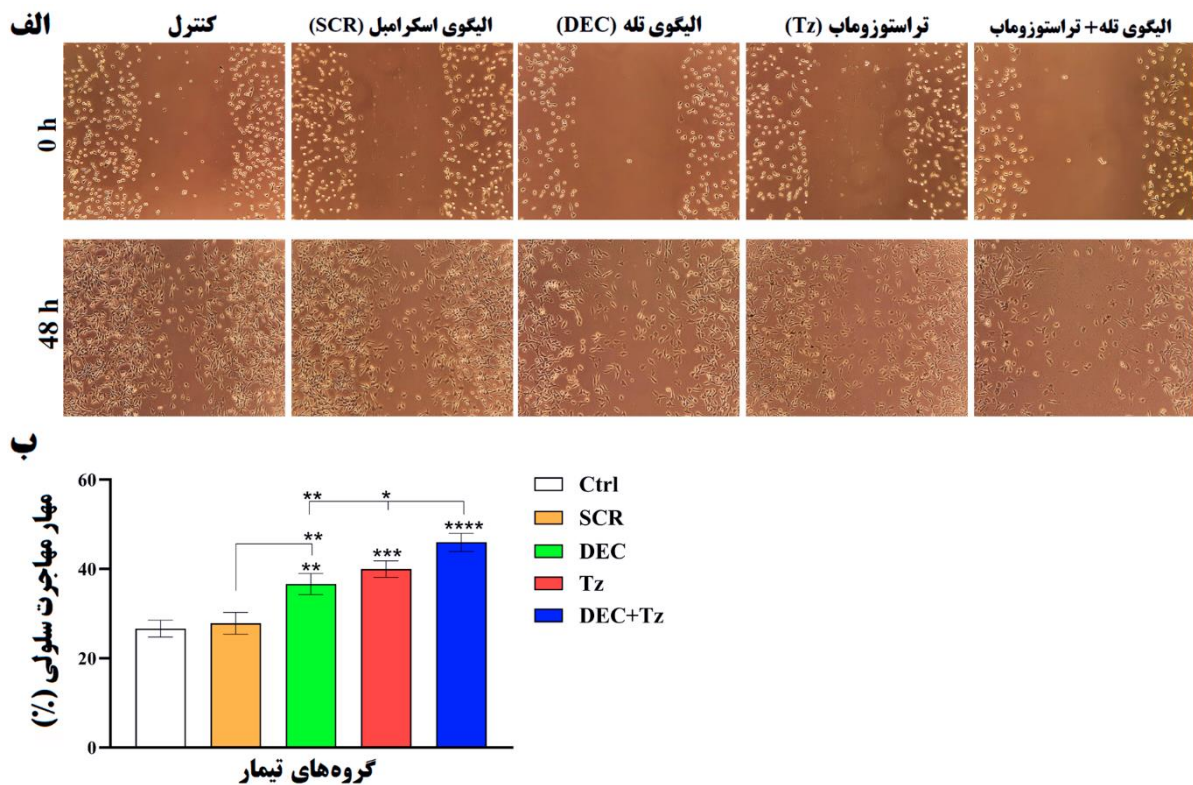
باهم نداشت، در صورتی که میزان آن در گروه تیمار شده با DEC+Tz بیش‌تر از گروه‌های تیمار شده با الیگوهای تله ($P < 0.01$ (**)) و تراستوزوماب ($P < 0.05$ (*)) به تنهایی



شکل ۲. بررسی اثر مهار غلظت‌های مختلفی از الیگوهای تله و اسکرامبل طراحی شده برای هدف قرار دادن STAT3 به همراه تراستوزوماب بر زنده‌مانی سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت بعد از تیمار. تیمار ترکیبی با DEC+Tz منجر به اثر هم‌افزایی در کاهش زنده‌مانی در رده‌ی سلولی HER2 مثبت SK-BR-3 شده است. نمودار آماری حاصل از آنالیز نتایج از آزمون One-way ANOVA ($P < 0.0001$ (***)).



شکل ۳. (الف) بررسی اثر الیگوهای طراحی شده تله و اسکرامبل برای هدف قرار دادن STAT3 به همراه تراستوزوماب بر میزان آپوپتوز سلولی در زمان ۲۴ ساعت بعد از تیمار. تیمار ترکیبی DEC+Tz بر افزایش آپوپتوز سلولی در رده‌ی سلولی HER2 مثبت SK-BR-3 اثر هم‌افزایی داشته است. رنگ Annexin V-FITC نیز در کانال FL1-H فلوجو خوانده و به عنوان محور افقی (x) در نظر گرفته شد. رنگ PI در کانال FL3-H فلوجو خوانده و به عنوان محور عمودی (y) در نظر گرفته شد. نمودار آماری حاصل از آنالیز نتایج از آزمون One-way ANOVA ($P < 0.0001$ (***)، $P < 0.001$ (***)، $P < 0.01$ (**)).



شکل ۴. الف) بررسی اثر الیگوهای طراحی شده تله و اسکراملیل برای هدف قرار دادن STAT3 به همراه تراستوزوماب بر مهار مهاجرت سلولی در زمان‌های صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار. تیمار ترکیبی DEC+Tz بر مهار مهاجرت سلولی در رده‌ی سلولی HER2 مثبت SK-BR-3 اثر هم‌افزایی داشته است. ب) نمودار آماری حاصل از آنالیز نتایج از آزمون One-way ANOVA [P<0.0001(****), P<0.001(***), P<0.01(**), P<0.05(*)].

زنده ماندن نیستند، اما می‌توانند با استفاده از مسیرهای پیام‌رسانی جایگزین به رشد خود ادامه دهند، بنابراین مهار این فاکتورهای رونویسی یک روش درمانی جذاب و ایمن برای سرطان است [۴۵،۴۴].

برای مهار فعالیت STAT3 می‌توان از مواد شیمیایی و توالی‌های الیگونوکلوئیدی مختلفی استفاده کرد. الیگونوکلوئیدهایی مانند میکروRNAها، siRNAها، الیگودئوکسی نوکلئوتیدهای تله، آبتامرها و غیره اختصاصی‌تر از مواد شیمیایی عمل می‌کنند؛ بنابراین می‌توانند جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی باشند [۴۷،۴۶]. استفاده از الیگوهای تله برای هدف‌گیری درمانی فاکتور رونویسی STAT3 از مزایای قابل توجهی نظیر سنتز راحت، عدم نیاز به ناقل‌های ویروسی و غیرویروسی خاص جهت انتقال به سلول‌ها و نگهداری ساده و کم‌هزینه الیگوها برخوردار است [۴۹،۴۸]. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که بیان بیش از حد HER2 در بافت سرطان پستان موجب زنده‌مانی کم‌تر بیماران می‌شود. اگرچه تراستوزوماب در بیماران سرطان پستان مهاجم HER2 مثبت کارایی بالایی نشان می‌دهد، اما هنوز هم برخی از بیماران نمی‌توانند به طور مؤثر با تراستوزوماب درمان شوند [۵۰]؛ بنابراین استفاده از این دارو در کنار سایر

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع و مرگ‌ومیر بالای بیماری سرطان، به‌ویژه سرطان پستان در زنان و شکست رویکردهای درمانی متداول سبب شده تا مطالعات گسترده‌ای بر روی مکانیسم‌های موثر در تومورزایی، مقاومت به درمان و بازگشت مجدد تومورها صورت گیرد [۳۸]. فاکتورهای رونویسی مختلفی مستقیماً با پیشرفت و توسعه سرطان پستان مرتبط هستند [۳۹]. خانواده STAT که از نظر ساختاری مشابه و بسیار حفاظت شده می‌باشند شامل هفت فاکتور رونویسی STAT1، STAT2، STAT3، STAT4، STAT5a، STAT5b، STAT6 است که از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی دخیل در سرطان پستان هستند [۴۱،۴۰،۱۰]. فعالیت STAT3 به دلیل افزایش رگ زایی، تأثیرات ضد آپوپتوزی و فرار از سیستم ایمنی با پیشرفت سرطان ارتباط مستقیم دارد و به‌عنوان یک فاکتور پیش‌بینی‌کننده ضعیف عمل می‌کند [۴۳،۴۲]. سلول‌های سرطانی بسیار بیش‌تر از سلول‌های غیر سرطانی وابسته به فعالیت پروتئین‌های STAT می‌باشند. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که مهار STAT3 و STAT5 باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. اگرچه سلول‌های غیر سرطانی در سطوح پایینی از پروتئین‌های STAT3 و STAT5 قادر به

مطالعه‌ی مرلین و همکاران نشان داد که تراستوزوماب در غلظت ۳۳۸ نانومولار باعث کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی SK-BR-3، MCF-7، MDA-MB-453 به میزان ۳۰٪ می‌شود [۵۲]. مطالعه دیگری نشان داد که زنده‌مانی رده‌های سلولی HuHER2 در شرایط تیمار با غلظت ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تراستوزوماب به ۵۰٪ کاهش می‌یابد و این اثر مهاري تراستوزوماب بر زنده‌مانی این رده‌های سلولی به طور قابل توجهی با میزان بیان HER2 مرتبط است [۵۳]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با الیگوهای تله و تراستوزوماب به تنهایی، ترانسفکشن الیگوهای تله به همراه تراستوزوماب (DEC+Tz) به طور قابل توجهی زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی آن‌ها در کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی SK-BR-3 است.

جهت تأیید اثر مهاري توالی‌های تله و داروی تراستوزوماب بر رشد و تکثیر سلولی و صحت نتایج MTT، از آزمون آپوتوز سلولی استفاده شد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که مهار فعالیت یا انتقال فاکتور رونویسی STAT3 به هسته‌ی سلول، با القای توقف چرخه‌ی سلولی و افزایش آپوتوز (از طریق تنظیم بیان ژن‌های ضد آپوتوزی مانند Bcl-2 و xL) سبب سرکوب رشد تومور می‌شود [۵۴، ۵۵]. بیان بیش از حد HER2 سطوح miR15a و miR16 را که Bcl-2 را هدف قرار می‌دهند سرکوب می‌کند و منجر به افزایش بیان Bcl-2 می‌شود [۵۶]. هدف قرار دادن HER2 با تراستوزوماب باعث کاهش بیان Bcl-2، Survivin، Mcl-1 و Phospho-Bad همراه با افزایش بیان پروآپوتوز Bnip3 می‌شود که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود [۵۷-۶۰]. در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آزمون آپوتوز نشان داد که مهار فعالیت STAT3 با توالی‌های تله‌ی طراحی شده سبب افزایش تقریباً ۱۱ درصدی سلول‌های آپوتوزی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. در گروه اسکرامبل تقریباً ۶٪ سلول‌ها دچار آپوتوز شده‌اند که تفاوت معناداری از نظر آماری با گروه کنترل ندارد. همچنین تیمار سلول‌ها با تراستوزوماب باعث افزایش تقریباً ۱۴ درصدی آپوتوز می‌شود. میزان آپوتوز القا شده در گروه تحت تیمار ترکیبی با الیگوهای تله و تراستوزوماب در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با الیگوهای تله یا تراستوزوماب به تنهایی به طور معناداری بالاتر بود که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی آن‌ها می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که مسدود کردن مسیرهای JAK/STAT3 و HER2 می‌تواند به طور مؤثری آپوتوز سلول‌های سرطان پستان را در شرایط آزمایشگاهی افزایش دهد.

روش‌های درمانی نوین برای درمان سرطان پستان ضروری به نظر می‌رسد.

از آنجایی که رده‌ی سلولی سرطان پستان SK-BR-3 بیان بالایی از فاکتور رونویسی STAT3 و گیرنده HER2 را دارا است، به همین دلیل مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات ضد سرطانی درمان ترکیبی با استفاده از الیگوهای تله‌ی فاکتور رونویسی و تراستوزوماب می‌باشد. بر این اساس، این رده سلولی در معرض غلظت‌های مختلفی از الیگوهای تله‌ی STAT3 و تراستوزوماب قرار گرفت و اثرات ضد سرطانی آن با استفاده از سنجش‌های نظیر MTT، آپوتوز سلولی و آزمون ترمیم زخم یا خراش ارزیابی شد.

در مطالعات قبلی نشان داده شده است که استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بر پروفایل بیان ژنی بی‌اثر می‌باشد [۵۱]، بنابراین در این مطالعه از لیپوفکتامین جهت انتقال الیگوها به داخل سلول استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی کارایی ترانسفکشن با فلوسایتمتری نشان داد که با افزایش غلظت الیگوهای نشان‌دار شده با رنگ فلوروفور Cy3، میزان ورود به سلول الیگوها افزایش می‌یابد. شایان ذکر است که میزان ترانسفکشن در غلظت ۱۰۰ نانومولار و ۳۰۰ نانومولار تفاوت معناداری با هم‌دیگر نداشت به همین دلیل تصمیم گرفته شد که برای ادامه ارزیابی‌ها تنها از غلظت ۱۰۰ نانومولار از الیگوهای تله و اسکرامبل استفاده شود. در مطالعات قبلی ما نیز بالاترین نرخ انتقال موثر الیگوها به سلول‌های سرطان پستان سه گانه منفی MDA-MB-231 زمانی به دست آمد که از غلظت‌های ۳۰۰ و ۵۰۰ نانومولار از الیگوها به همراه لیپوفکتامین ۲۰۰۰ استفاده شد [۳۱].

نتایج MTT نشان داد اگرچه تیمار با الیگوهای تله باعث کاهش زنده‌مانی سلولی می‌شود، اما الیگوهای اسکرامبل اثر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلولی در مقایسه با گروه کنترل ندارند. در مطالعه‌ای که توسط رحمتی و همکاران انجام گرفت حداکثر نرخ کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 ($P < 0.001$) در زمان ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن مشاهده شد که پتانسیل بازدارندگی رشد الیگوهای تله‌ی STAT3 را به صورت وابسته به مقدار تأیید کرد، اما اثرات مهاري الیگوهای اسکرامبل در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با الیگوهای تله ناچیز بود [۳۱]. در مطالعه حاضر از آنجایی که تفاوت معناداری بین اثر بازدارندگی بر رشد سلولی توسط الیگوهای تله در غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ نانومولار مشاهده نشد، بنابراین برای سنجش‌های بعدی از الیگوهای تله با غلظت ۱۰۰ نانومولار استفاده شد. تراستوزوماب به تنهایی به صورت وابسته به دوز میزان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش داد.

الیگودنوکی نوکلئوتیدی طراحی شده علیه STAT3 و نیز داروی تراستوزوماب در مسدود کردن گیرنده‌های HER2 بتواند با هدف قرار دادن مسیرهای پیام‌رسانی مربوطه به‌طور کاملاً اختصاصی و کارآمد و متعاقباً با مهار قابلیت‌های پرتوانی و تومورزایی، مقاومت تومورها به درمان‌های متداول را شکست دهد. پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده از نانوحامل‌های زیست سازگار استفاده شود تا با افزایش کارایی انتقال بتوان این روش درمانی در تحقیقات حیوانی مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب با کدهای سمات (A-10-500-16) و اخلاق (IR.SEMUMS.REC.1401.186) از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سمنان است.

مشارکت و نقش نویسندگان

بهروز جوهری: ایده و طراحی مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها، نگارش نسخه اول مقاله، سارا حیدری و سمیه رشیدی: جمع‌آوری داده‌ها، رقیه قربانی و حمید معدنچی: آنالیز و تفسیر نتایج و تأیید نسخه نهایی مقاله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تأیید نمودند.

منابع

- [1] Xia C, Dong X, Li H, Cao M, Sun D, He S, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J* 2022; 135: 584-590. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002108> PMID:35143424 PMCID:PMC8920425
- [2] Dhankhar R, Vyas SP, Jain AK, Arora S, Rath G, Goyal AK. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 2010; 38: 230-249. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.494578> PMID:20677900
- [3] Wu Q, Yang Z, Nie Y, Shi Y, Fan D. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett* 2014; 347: 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.044> <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013> PMID:24657660
- [4] Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 52-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018> PMID:25813885
- [5] Mi Y, Shao Z, Vang J, Kaidar-Person O, Wang AZ. Application of nanotechnology to cancer radiotherapy. *Cancer Nanotechnol* 2016; 7: 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12645-016-0024-7> PMID:28066513 PMCID:PMC5167776
- [6] Borrebaeck CA, Carlsson R. Human therapeutic antibodies. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 404-408. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00070-4) PMID:11710740
- [7] Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies.

مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی نقش بسیار مهمی در متاستاز و شکست درمانی سرطان‌ها دارد. STAT3 از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند تنظیم ماتریزوم و مسیرهای پیام‌رسانی دیگر، مهاجرت و تهاجم سلول‌های توموری را مدیریت و تنظیم می‌کند [۶۲،۶۱]. مطالعات گذشته نشان دادند که تیمار با تراستوزوماب، مهاجرت سلول‌های سرطان پستان را از طریق کاهش بیان Talin2 در شرایط آزمایشگاهی و درون‌تنی مهار می‌کند. Talin1 و Talin2 پروتئین‌های اسکلت سلولی متصل شونده به اکتین هستند که نقش کلیدی در پیام‌رسانی سلولی، چسبندگی و مهاجرت دارند [۶۴،۶۳]. در مطالعه حاضر توانایی مهاجرت سلول‌های SK-BR-3 پس از مهار فاکتور رونویسی STAT3 با الیگوهای تله و تیمار با تراستوزوماب از طریق آزمون ترمیم زخم یا خراش مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد مهار مهاجرت سلول‌های گروه تیمار شده با الیگوهای تله STAT3 در مقایسه با گروه‌های کنترل و اسکرامبل به‌طور معناداری افزایش پیدا کرد. همچنین تراستوزوماب نیز توانایی مهار مهاجرت را در رده سلولی SK-BR-3 دارد که این توانایی در گروه تیمار ترکیبی با الیگوهای تله و تراستوزوماب بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی این دو تیمار در مهار مهاجرت سلولی است؛ بنابراین مهار فعالیت STAT3 و نیز گیرنده‌های HER2 می‌تواند قابلیت مهاجرت و تهاجم سلول‌های SK-BR-3 سرطان پستان را به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش دهند که این نتایج در راستای مطالعات قبلی گروه تحقیقاتی حاضر در رابطه با بررسی اثرات ضدآپوپتوزی توالی‌های تله c-Myc، Oct4، Sox2 و STAT3 بر سلول‌های سرطانی مختلف است [۲۹-۳۵،۳۱].

در رابطه با محدودیت‌های این کار پژوهشی می‌توان به ناپایداری و نیمه عمر پایین توالی‌های الیگودنوکی نوکلئوتیدهای تله به علت هضم توسط نوکلئازهای داخل سلولی اشاره کرد که ضروری است جهت بالا بردن پایداری الیگوها از اصلاحات ساختاری نظیر فسفوروئیوئید کردن (که در این مطالعه انجام شده است)، دمبل شکل کردن و ... استفاده شود. از دیگر محدودیت‌ها می‌توان به محدود بودن روش استفاده (تنها به صورت داخل توموری) و نیز کارایی انتقال پایین داروهای ترکیبی (الیگوهای تله و تراستوزوماب) به لایه‌های مرکزی تومور اشاره کرد که جهت رفع این مشکل نیاز به استفاده از نانوسامانه و کاترئوگاسیون با پپتیدهای نفوذکننده به سلول (CPP) می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌توان امیدوار بود که اثرات هم‌افزایی ایجاد شده توسط تله‌ی

- [24] Hajighasemlou S, Alebouyeh M, Rastegar H, Manzari MT, Mirmoghataei M, Moayedi B, et al. Preparation of immunotoxin herceptin-botulinum and killing effects on two breast cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 5977-5981.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5977>
PMid:26320483
- [25] Wang N, Wei L, Huang Y, Wu Y, Su M, Pang X, et al. miR520c blocks EMT progression of human breast cancer cells by repressing STAT3. *Oncol Rep* 2017; 37: 1537-1544.
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5393>
PMid:28112380
- [26] Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang LQ, Nabel GJ. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* 1990; 250: 997-1000.
<https://doi.org/10.1126/science.2237444>
PMid:2237444
- [27] Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor- κ B binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997; 3: 894.
<https://doi.org/10.1038/nm0897-894>
PMid:9256281
- [28] Mann MJ, Dzau VJ. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* 2000; 106: 1071-1075.
<https://doi.org/10.1172/JCI11459>
PMid:11067859 PMCID:PMC301425
- [29] Johari B, Ebrahimi-Rad M, Maghsood F, Lotfinia M, Saltanatpouri Z, Teimoori-Toolabi L, et al. Myc decoy oligodeoxynucleotide inhibits growth and modulates differentiation of mouse embryonic stem cells as a model of cancer stem cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17: 1786-1795.
<https://doi.org/10.2174/1871521409666170412142507>
PMid:28403778
- [30] Johari B, Zargan J. Simultaneous targeted inhibition of Sox2-Oct4 transcription factors using decoy oligodeoxynucleotides to repress stemness properties in mouse embryonic stem cells. *Cell Biol Int* 2017; 41: 1335-1344.
<https://doi.org/10.1002/cbin.10847>
PMid:28833847
- [31] Rahmati M, Johari B, Kadivar M, Rismani E, Mortazavi Y. Suppressing the metastatic properties of the breast cancer cells using STAT3 decoy oligodeoxynucleotides: a promising approach for eradication of cancer cells by differentiation therapy. *J Cell Physiol* 2020; 235: 5429-5444.
<https://doi.org/10.1002/jcp.29431>
PMid:31912904
- [32] Gharbavi M, Johari B, Rismani E, Mousazadeh N, Taromchi AH, Sharafi A. NANOG decoy oligodeoxynucleotide-encapsulated niosomes nanocarriers: a promising approach to suppress the metastatic properties of U87 human glioblastoma multiforme cells. *ACS Chem Neurosci* 2020; 11: 4499-4515.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00699>
PMid:33283497
- [33] Sen M, Thomas SM, Kim S, Yeh JI, Ferris RL, Johnson JT, et al. First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer Discov* 2012; 2: 694-705.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0191>
PMid:22719020 PMCID:PMC3668699
- [34] Tripathi SK, Chen Z, Larjo A, Kanduri K, Nousiainen K, Åijö T, et al. Genome-wide analysis of STAT3-mediated transcription during early human Th17 cell differentiation. *Cell Rep* 2017; 19: 1888-1901.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.013>
PMid:28564606
- [35] Bigdelou Z, Mortazavi Y, Saltanatpour Z, Asadi Z, Kadivar M, Johari B. Role of Oct4-Sox2 complex decoy oligodeoxynucleotides strategy on reverse epithelial to mesenchymal transition (EMT) induction in HT29-ShE encompassing enriched cancer stem-like cells. *Mol Biol Rep* 2020; 47: 1859-1869.
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05280-2>
PMid:32016633
- Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 325-338.
<https://doi.org/10.1038/nrd3003>
PMid:20305665
- [8] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 1-28.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.04.007>
PMid:15207251
- [9] Hecker M, Wagner AH. Transcription factor decoy technology: A therapeutic update. *Biochem Pharmacol* 2017; 144: 29-34.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.122>
PMid:28642036
- [11] Huynh J, Chand A, Gough D, Ernst M. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer-using tissue repair as a road map. *Nat Rev Cancer* 2019; 19: 82-96.
<https://doi.org/10.1038/s41568-018-0090-8>
PMid:30578415
- [12] Ma JH, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal* 2020; 18: 1-13.
<https://doi.org/10.1186/s12964-020-0527-z>
PMid:32111215 PMCID:PMC7048131
- [13] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
PMid:21376230
- [14] Mitsuyama K, Matsumoto S, Masuda J, Yamasaki H, Kuwaki K, Takedatsu H, et al. Therapeutic strategies for targeting the IL-6/STAT3 cytokine signaling pathway in inflammatory bowel disease. *Anticancer Res* 2007; 27: 3749-3756.
- [15] Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, et al. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; 7: 575-589.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.007>
PMid:15950906
- [16] Ahmed S, Sami A, Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer* 2015; 22: 101-116.
<https://doi.org/10.1007/s12282-015-0587-x>
PMid:25634227
- [17] Wang T, Xu Y, Sheng S, Yuan H, Ouyang T, Li J, et al. HER2 somatic mutations are associated with poor survival in HER2-negative breast cancers. *Cancer Sci* 2017; 108: 671-677.
<https://doi.org/10.1111/cas.13182>
PMid:28164408 PMCID:PMC5406600
- [18] Connell CM, Doherty GJ. Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open* 2017; 2: e000279.
<https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000279>
PMid:29209536 PMCID:PMC5708307
- [19] Li R, Chibbar R, Xiang J. Novel EXO-T vaccine using polyclonal CD4(+) T cells armed with HER2-specific exosomes for HER2-positive breast cancer. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 7089-7093.
<https://doi.org/10.2147/OTT.S184898>
PMid:30410365 PMCID:PMC6200095
- [20] Torti SV, Torti FM. Cellular iron metabolism in prognosis and therapy of breast cancer. *Crit Rev Oncol* 2013; 18: 435-448.
<https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2013007784>
PMid:23879588 PMCID:PMC3736347
- [22] Crawford A, Nahta R. Targeting Bcl-2 in herceptin-resistant breast cancer cell lines. *Curr Pharmacogenomics Person Med* 2011; 9: 184-190.
<https://doi.org/10.2174/187569211796957584>
PMid:22162984 PMCID:PMC3233239
- [21] Cui H, Cheng Y, Piao SZ, Xu YJ, Sun HH, Cui X, et al. Correlation between HER-2/neu(erbB-2) expression level and therapeutic effect of combination treatment with HERCEPTIN and chemotherapeutic agents in gastric cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2014; 14: 10.
<https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-10>
PMid:24472145 PMCID:PMC3915235
- [23] Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1147-1157.
<https://doi.org/10.1038/nbt1137>
PMid:16151408

139.
<https://doi.org/10.1196/annals.1359.021>
 PMID:16394132
- [50] Horton J. Trastuzumab use in breast cancer: clinical issues. *Cancer Control* 2002; 9: 499-507.
<https://doi.org/10.1177/107327480200900607>
 PMID:12514568
- [51] Rad SM, Bamdad T, Sadeghizadeh M, Arefian E, Lotfinia M, Ghanipour M. Transcription factor decoy against stem cells master regulators, Nanog and Oct-4: a possible approach for differentiation therapy. *Tumor Biol* 2015; 36: 2621-2629.
<https://doi.org/10.1007/s13277-014-2884-y>
 PMID:25464862
- [52] Merlin JL, Barberi-Heyob M, Bachmann N. In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin®) combined with paclitaxel (Taxol®) or docetaxel (Taxotere®) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann Oncol* 2002; 13: 1743-1748.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdf263>
 PMID:12419746
- [53] Park S, Nedrow JR, Josefsson A, Sgouros G. Human HER2 overexpressing mouse breast cancer cell lines derived from MMTV. f. HuHER2 mice: characterization and use in a model of metastatic breast cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 68071.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19174>
 PMID:28978097 PMCid:PMC5620237
- [54] Wei D, Zhang G, Zhu Z, Zheng Y, Yan F, Pan C, et al. Nobiletin inhibits cell viability via the SRC. AKT/STAT3/YY1AP1 pathway in human renal carcinoma cells. *Front Pharmacol* 2019.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00690>
 PMID:31354472 PMCid:PMC6635658
- [55] Ramirez de Arellano A, Lopez-Pulido EI, Martinez-Neri PA, Estrada Chavez C, Gonzalez Lucano R, Fafutis-Morris M, et al. STAT3 activation is required for the antiapoptotic effects of prolactin in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* 2015; 15: 83.
<https://doi.org/10.1186/s12935-015-0234-9>
 PMID:26346346 PMCid:PMC4559880
- [56] Cittelly DM, Das PM, Salvo VA, Fonseca JP, Burow ME, Jones FE. Oncogenic HER2Δ16 suppresses miR-15a/16 and deregulates BCL-2 to promote endocrine resistance of breast tumors. *Carcinogenesis* 2010; 31: 2049-2057.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq192>
 PMID:20876285 PMCid:PMC2994280
- [57] Chakrabarty A, Bholra NE, Sutton C, Ghosh R, Kuba MG, Dave B, et al. Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-Survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. PI3K inhibition sensitizes trastuzumab-resistant cells. *Cancer Res* 2013; 73: 1190-1200.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2440>
 PMID:23204226 PMCid:PMC3563941
- [58] Real PJ, Benito A, Cuevas J, Berciano MT, de Juan A, Coffey P, et al. Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L. *Cancer Res* 2005; 65: 8151-8157.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1134>
 PMID:16166289
- [59] Oliveras-Ferreras C, Vazquez-Martin A, Cufi S, Torres-Garcia VZ, Sauri-Nadal T, Del Barco S, et al. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407: 412-419.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.039>
 PMID:21402055
- [60] Seoane S, Montero JC, Ocaña A, Pandiella A. Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-overexpressing breast cancer cells. *J Nat Cancer Instit* 2010; 102: 1432-1446.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djq315>
 PMID:20811002
- [61] Wang J, Guo XJ, Ding YM, Jiang JX. miR-1181 inhibits invasion and proliferation via STAT3 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2017; 23: 1594-1601.
- [36] Asadi Z, Fathi M, Rismani E, Bigdelou Z, Johari B. Application of decoy oligodeoxynucleotides strategy for inhibition of cell growth and reduction of metastatic properties in nonresistant and erlotinib-resistant SW480 cell line. *Cell Biol Int* 2021; 45: 1001-1014.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11543>
 PMID:33377576
- [37] Johari B, Rahmati M, Nasehi L, Mortazavi Y, Faghfoori MH, Rezaeejam H. Evaluation of STAT3 decoy oligodeoxynucleotides' synergistic effects on radiation and/or chemotherapy in metastatic breast cancer cell line. *Cell Biol Int* 2020; 44: 2499-2511.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11456>
 PMID:32841450
- [38] Woosley AN, Dalton AC, Hussey GS, Howley BV, Mohanty BK, Grelet S, et al. TGFβ promotes breast cancer stem cell self-renewal through an ILE1/LIFR signaling axis. *Oncogene* 2019; 38: 3794-37811.
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-0703-z>
 PMID:30692635 PMCid:PMC6525020
- [39] Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The human transcription factors. *Cell* 2018; 172: 650-665.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
 PMID:29425488
- [40] Furtek SL, Backos DS, Matheson CJ, Reigan P. Strategies and approaches of targeting STAT3 for cancer treatment. *ACS Chem Biol* 2016; 11: 308-318.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00945>
 PMID:26730496
- [41] Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* 2005; 114: 301-312.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02091.x>
 PMID:15720432 PMCid:PMC1782085
- [42] Senft C, Priester M, Polacin M, Schröder K, Seifert V, Kögel D, et al. Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J Neuro Oncol* 2011; 101: 393-403.
<https://doi.org/10.1007/s11060-010-0273-y>
 PMID:20589525
- [43] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 2005; 11: 1314.
<https://doi.org/10.1038/nm1325>
 PMID:16288283
- [44] Furqan M, Akinleye A, Mukhi N, Mittal V, Chen Y, Liu D. STAT inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 90.
<https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-90>
 PMID:24308725 PMCid:PMC4029528
- [45] Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 97.
<https://doi.org/10.1038/nrc1275>
 PMID:14964307
- [46] Ogura M, Uchida T, Terui Y, Hayakawa F, Kobayashi Y, Taniwaki M, et al. Phase I study of OPB-51602, an oral inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3, in patients with relapsed/refractory hematological malignancies. *Cancer Sci* 2015; 106: 896-901.
<https://doi.org/10.1111/cas.12683>
 PMID:25912076 PMCid:PMC4520642
- [47] Oh DY, Lee SH, Han SW, Kim MJ, Kim TY, et al. Phase I study of OPB-31121, an oral STAT3 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res Treat* 2015; 47: 607.
<https://doi.org/10.4143/crt.2014.249>
 PMID:25715763 PMCid:PMC4614199
- [48] Rad SM, Langroudi L, Kouhkan F, Yazdani L, Koupaee AN, Asgharpour S, et al. Transcription factor decoy: a pre-transcriptional approach for gene downregulation purpose in cancer. *Tumor Biol* 2015; 36: 4871-4881.
<https://doi.org/10.1007/s13277-015-3344-z>
 PMID:25835969
- [49] Mann MJ. Transcription factor decoys: a new model for disease intervention. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1058: 128-

345: 64-77.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.027>

PMid:20599891

[64] Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 2009; 324: 895-899.

<https://doi.org/10.1126/science.1163865>

PMid:19443776

[10] Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; 109: 1143-1148.

<https://doi.org/10.1172/JCI0215650>

PMid:11994402 PMCID:PMC150972

<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i9.1594>

PMid:28321160 PMCID:PMC5340811

[62] Kulesza DW, Ramji K, Maleszewska M, Mieczkowski J, Dabrowski M, Chouaib S, et al. Search for novel STAT3-dependent genes reveals SERPINA3 as a new STAT3 target that regulates invasion of human melanoma cells. *Lab Invest* 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41374-019-0288-8>

PMid:31278347

[63] Franco-Cea A, Ellis SJ, Fairchild MJ, Yuan L, Cheung TYS, Tanentzapf G. Distinct developmental roles for direct and indirect talin-mediated linkage to actin. *Dev Biol* 2010;

Anti-cancer effects of the combined treatment of trastuzumab and decoy oligodeoxynucleotides to target STAT3 transcription factor on SK-BR-3 breast cancer cell line

Behrooz Johari (Ph.D)¹, Roghayeh Ghorbani (M.Sc)^{*1}, Sara Heidari (M.Sc)¹, Somayyeh Rashidi (M.Sc)¹, Hamid Madanchi (Ph.D)^{*2}

1- Dept. of Medical Biotechnology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2 – Dept. of Biotechnology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 23 33654187- 24 33140235 roghayeh.ghorbani@yahoo.com-hamidmadanchi@yahoo.com Received: 14 Jun 2022; Accepted: 30 Nov 2022

Introduction: Breast cancer is the most common malignancy in the female population and is the leading cause of death. Surgery, chemotherapy, radiotherapy, and monoclonal antibody (trastuzumab) therapy are common and standard treatments for this cancer. However, there are significant limitations in the treatment of this disease by using regular methods. Given the role of transcription factors (TFs) in gene expression, differentiation therapy, and many cancer signaling pathways, in the present study, the effect of combined treatment of trastuzumab (Herceptin) and decoy oligodeoxynucleotides to target the STAT3 transcription factor on inhibition of HER2 positive SK-BR-3 cell line growth was investigated.

Materials and Methods: At first, different concentrations of Trastuzumab were prepared from 0.1 to 100 µg/mL. In this way, the decoy and scramble oligodeoxynucleotides were designed and synthesized to target the STAT3 transcription factor. The transfection efficiency and combined effects of trastuzumab with decoy oligos on cell viability, apoptosis, and cell migration inhibition were evaluated.

Results: The results showed that oligodeoxynucleotides labeled with Cy3 fluorophore (300 nM) enter the cells with high efficiency (81.7±6.9%). Combined treatment of cells by trastuzumab (10 µg/mL) along with decoy oligodeoxynucleotides (100 nM) led to a decrease in cell viability (58.86±2.71%), increased apoptosis (24.54±4.83%) and inhibited cell migration (45.95±4.21%).

Conclusion: The results from this study showed the anticancer effects of combination therapy using trastuzumab with decoy oligodeoxynucleotides to target the STAT3 transcription factor in SK-BR-3 cells. Therefore, it seems that this strategy can be used as an adjunct to common treatments for breast cancer.

Keywords: Breast cancer, HER2 receptor, Oligodeoxynucleotide decoy, STAT3 transcription factor, Apoptosis, Cell migration