Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 4, Oct. – Nov. 2014, Pages: 10-13

The Effect of Plgf Gene Knockdown on Enzymes Metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2&-9) Activity

Hassan Akrami[1], Mansour Aminzadeh[1], Ameneh Sharifi[2]*

[1]Department of Biology, School of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
[2]Marital Counseling Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Received: 24 Sep, 2013 Accepted: 15 Dec, 2013

Abstract

Background and Objectives: Placental Growth Factor (PlGF) is a member of Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) family, which is involved in several pathologic processes, including the growth and spread of malignancies. PlGF promote cancer metastasis by controlling the MMP (Matrix metalloproteinase) activity. In the present study, we investigate the correlation between the expression of PlGF and matrix metalloproteinase enzymes activity in human Adenocarcinoma Gastric Cell (AGC).

Methods and Materials: Human AGC were treated with 20, 40 and 80 picomol concentrations small interfering RNA (siRNA) related to PlGF mRNA for24, 48 and 72 hours. Then MMP-2 and MMP-9 enzymatic activity was measured by gelatin zymography test.

Results: The gelatin zymography results indicated that the activity of MMP2&9 was fully inhibited in AGC which were treated with various concentrations of PlGF-siRNA for 24 hours. Our results also showed that in cells were treated with PlGF-siRNA for 48 hours the activity of MMP2 and MMP 9 were decreased (but not fully inhibited).

Conclusion: According to this study reduction of PlGF gene expression may prevents MMP2/9 activity in AGC. These data suggest that PlGF may function up stream of MMP in gastric adenocarcinoma *cells.* Probably PlGF effect on cancer cell metastasis via regulation activity of MMPs.

Keyword: Placenta Growth Factor (Plgf), Adenocarcinoma Gastric *Cell (AGC), Metalloproteinases* Enzymes

*Corresponding author:
E-mail: A_sharifi_genetic@yahoo.com

مقاله پژوهشی

اثر کاهش بیان PlGF بر فعالیت آنزیم‌های متالو پروتئیناز ۲ و ۹ (MMP-2 & -9)

حسن اکرمی[۱]، منصور امین زاده[۱]، آمنه شریفی[۲*]

[۱]گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
[۲]مرکز مشاوره قبل از ازدواج، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

دریافت: ۹۲/۷/۲ پذیرش: ۹۲/۹/۲۴

چکیده

زمینه و اهداف: فاکتور رشد جفتی (Placental Growth Factor, PlGF) از اعضای خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) می باشد که در فرایندهای پاتولوژیک متعدد از جمله: رشد و گسترش سرطان در انواع مختلف سرطان‌ها نقش دارد. PlGF، متاستاز سلول های سرطانی را از طریق کنترل بر فعالیت آنزیم‌های متالوپروتئیناز MMP (Matrix metalloproteinase) القا می کند در مطالعه حاضر، ارتباط بین بیان PlGF و فعالیت آنزیم‌های MMP بر سلول‌های سرطان معده (AGC) بررسی می شود.

مواد و روش ها: سلول‌های آدنوکارسینومای معده (AGC) در دو بازه زمانی ۲۴و ۴۸ ساعت و با غلظت ۲۰، ۴۰ و ۸۰ پیکومول siRNA مرتبط با ژن PlGF تیمار و سپس فعالیت متالوپروتئینازهای ۲و۹ با استفاده از روش ژلاتین-زایموگرافی اندازه‌گیری شد.

یافته ها: نتایج ژلاتین زایموگرافی نشان داد در سلول های AGC که باغلظت های مختلف PLGF-siRNA به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند فعالیت MMP های ۲و ۹ به طور کامل مهار شد. نتایج ما همچنین نشان داد که در سلول هایی که با PLGF-siRNA به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند فعالیت MMP های ۲و ۹ کاهش یافت. (اما به طور کامل مهار نشد).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان می دهند که احتمالاً کاهش بیان ژن PlGF منجر به مهار فعالیت MMP-2,-9 در سلول‌های AGC می‌گردد. این داده ها نشان می دهد که PlGF ممکن است بر عملکرد MMP ها در سلول های سرطان معده تاثیر گذار باشد احتمالا PlGF با تنظیم فعالیت MMP ها بر متاستاز سلول های AGC نقش دارد.

کلید واژه ها: فاکتور رشد جفتی (PlGF)، سلول‌های سرطان معده (AGC)، متاستاز، آنزیم های متالو پروتئیناز.

* ایمیل نویسنده رابط: A_sharifi_genetic@yahoo.com

مقدمه

تهاجم و متاستاز از خصوصیات بیولوژیک تومورهای بدخیم و علت عمده عوارض جسمی و مرگ و میر به علت سرطان می‌باشند. شایع ترین محل متاستاز سرطان به ترتیب حروف الفبا، استخوان، کبد، و ریه می باشد. در سلول‌های سرطانی از بیان برخی از پروتئین‌ها جلوگیری می‌شود. این تغییرات در بیان پروتئین‌های سلولی باعث می‌شود سلول سرطانی، ارتباط خود را با سلول‌های مجاور از دست دهد و با تجزیه ماتریکس بین‌سلولی، از محل اولیه خود مهاجرت کرده و به محل دیگری برود و در آنجا نیز باعث ایجاد تومور شود (۱). ماتریکس متالوپروتئینازها خانواده‌ای از اندوپپتیدازهای حاوی عنصر روی، (Zn)، هستند که با شکستن باندهای پپتیدی، پروتئین‌ها را تجزیه می کنند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله اندام‌زایی، ترمیم زخم، متاستاز تومور و رگ زایی نقش دارند (۲). تخریب ماتریکس خارج سلولی منجر به تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری می شود. براساس سوبستراهای اختصاصی و ساختار دومن متالوپروتئینازها آنها را به چهار گروه تقسیم می کنند که یکی از این زیر گروه‌ها از ژلاتین و کلاژن به عنوان سوبسترا استفاده می‌نمایند. این زیر گروه MMP ژلاتیناز شامل دو عنصر (MMP-2 ژلاتیناز) A و MMP-9 (ژلاتیناز B) می باشد که قادر به تجزیه کلاژن نوع۴ (IV) می باشند. افزایش بیان و فعالیت MMP-2,-9 در تومورها منجر به تخریب غشای پایه و گام اساسی در تهاجم تومور می باشد. در این رابطه، ارتباط بین بیان بالایی از MMP-2 و کاهش بقا در بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌باشد (۳،۴). همچنین بر طبق مطالعات انجام گرفته شده بر روی سلول های سرطان معده، تاثیر MMP-2 بر متاستاز این رده سلولی مشاهده شده است (۵). فاکتور رشد جفتی (PlGF)، عضوی از خانواده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF) است(۶)، که با اتصال به گیرنده اختصاصی خود (VEGFR1) (۷) و تحریک مسیرهای سیگنالی داخل سلولی متعددی همانند p38 MAPK و ERK1,2 منجر به القاء متاستاز در سلول‌های سرطان سینه می گردد. PlGF در مسیر P38 MAPK با

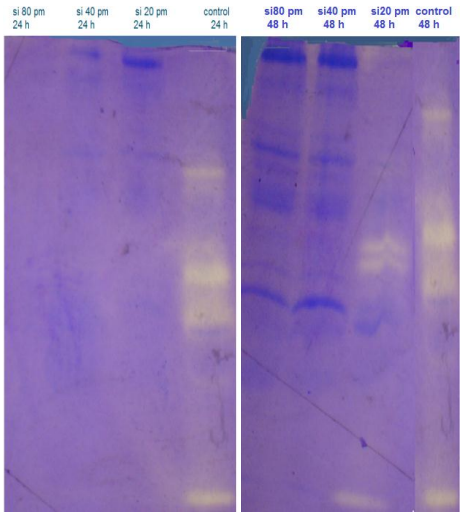
تاثیر بر HSP27 و MMP های 2 و 9 بر متاستاز سلول‌های سرطان سینه دخالت دارد(۸). مطالعات نشان می دهد که PlGF با تاثیر بر MMP-9 منجر به متاستاز سلول‌های سرطان ریه در موش می‌شود (۸). به دلیل نقش PlGF در متاستاز بعنوان یک فاکتور رشد پروتئاستازی نام گرفته است (۹). در مطالعه ای که در ایران بر سلول های AGC انجام گرفته شده، تاثیر بیان PlGF را بر مهاجرت این سلول ها گزارش نموده اند (۱۰). با توجه به مطالعات ذکر شده و تاثیر پروتئین های MMP بر متاستاز سلول های سرطانی، در این تحقیق سعی شده فرایند مهاجرت سلول های AGC با تاثیر ژن PlGF بر پروتئین های MMP-2,-9 مشخص گردد. با توجه به اهمیت یافتن شیوه‌های نو و کارآمد برای درمان ریشه‌ای سرطان‌ها، فن‌آوری siRNA در مقایسه با روش‌های آنتی سنس از توانایی به مراتب بیش‌تری برخوردار است. در این مطالعه، جهت مهار بیان ژن PlGF از فن آوری siRNA استفاده شد و کاهش بیان ژن PlGF بر متاستاز سلول‌های سرطان معده (AGC) با تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های ۹و۲-MMP بررسی شد. بکارگیری siRNA کارآمد با اثر مهاری بالا در شناسایی نقش ژن PlGF در فرایند متاستاز مفید می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه یک مطالعه تحقیقی-کاربردی است که در سال ۹۱ در دانشگاه رازی کرمانشاه انجام گرفت. در این تحقیق از سلول‌های رده آدنوکارسینومای معده (AGC) که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد استفاده گردید. برای بوجود آمدن شرایط بهینه آزمایش سلول‌های (AGC) را به میزان $۲*۱۰^{۶}$ در پلیت های ۶ خانه ای، در محیط کشت RPMI 1640 (SIGMA) دارای ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (Fetal bovin serum, BIOCROM AG) ، پنی سیلین صد میکرو یونیت در میلی لیتر و استرپتومایسین صدمیکروگرم در میلی لیتر (SIGMA) تحت شرایط ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند. برای شروع فرآیند ترانسفکشن سلول‌های (AGC) با siRNA، بر طبق دستورالعمل کارخانه، ابتدا غلظت مورد نظر ازPlGF- siRNA (۲۰، ۴۰و ۸۰ پیکومول) به محیط Transfection medium (۱۰۰ میکرولیتر) حل شده. سپس غلظت مناسب از X-termeGENE (۴ میکرولیتر) نیز در محیط Transfection medium (۱۰۰ میکرولیتر) حل شد، بعد این دو محلول با هم مخلوط شد (siRNA –X- TERMEgene) و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای محیط نگه داشته شد بعد از گذشت زمان مورد نظر ۸۰۰ مایکرولیتر transfection medium که فاقد سرم و آنتی بیوتیک می‌باشد اضافه شد. سپس کمپلکس مورد نظر به سلول های آماده شده برای ترانسفکشن اضافه گردید. سلول‌های ترانسفکت شده به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۵ درصد و غلظت CO2 برابر ۵ درصد) نگهداری شد. یک سری از چاهک‌ها به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که فقط حاوی سلول‌های AGC بدون تیمار بوده است. پس از آن مایع رویی هر چاهک به طور مجزا با سر سمپلر جمع آوری شده و از آن برای انجام تست زایموگرافی استفاده گردید. به منظور بررسی میزان ممانعت کنندگی فعالیت آنزیم MMP های ۹,۲ (متالوپروتئینازها) تولید شده از رده سلولی (AGC) میزان ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی چاهک‌های سلولی در غلظت‌های مختلف جهت بارگذاری نمونه‌ها روی ژل ۰/۱٪ ژلاتین استفاده شد. الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید محتوی ژلاتین در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) انجام شد که مقادیر اضافی آن با شستشوهای مکرر با محلول تریتون X-100 حذف گردید و سپس ژل به مدت ۴۸ ساعت در بافر فعال کننده ژلاتیناز قرار گرفت ودر نهایت با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شد. پس از رنگ‌زدایی، مناطق پروتئولیز شده به عنوان باندهای روشن در زمینه آبی ژل قابل رویت می باشد.

یافته ها

نتایج حاصل از شکل ۱ نشان دهنده اثر بازدارندگی siRNA بر MMP-2,-9در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. همانطور که در تصویر دیده می‌شود در بازه زمانی ۲۴ ساعت، مهار فعالیت MMP-2,-9 در هر سه غلظت تیمار نسبت به نمونه کنترل مشاهده شد؛ در حالیکه در بازه زمانی ۴۸ ساعت، کاهش اثر مهاری غلظت ۲۰ پیکومول siRNA علیه PIGF بر فعالیت آنزیم MMP-2 به نسبت دو غلظت ۴۰و ۸۰ پیکومول و همچنین نسبت به آنزیم MMP-9در هر سه غلظت مشاهده گردید.



شکل ۱: اثر تیمار سلول های اپی تلیال با PlGF- siRNA بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲و۹ با کمک ژلاتین زایموگرافی. نواحی روشن در اثر فعالیت ژلاتینازی MMP-2,-9بوجود آمده اند. به ترتیب از چپ به راست بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت را نشان می دهد.

بحث

مهاجرت سلول‌های سرطانی و تهاجم، اولین مرحله در متاستاز و علت اصلی مرگ مرتبط با سرطان می باشد. فاکتورهای رشدی همانند PlGF با فعال کردن مسیرهای سیگنالی داخل سلولی باعث مهاجرت سلول‌های سرطانی می شوند. از زمان کشف ژنPlGF که در حدود ۲۲ سال پیش ۱۹۹۱ می‌باشد (۶) مطالعات زیادی برای شناخت این ژن و مسیرهای سیگنالی مربوط به آن شده است تاکنون توسط محققین مختلف، نقش PlGF در متاستاز و دیگر فعالیت‌های بیولوژیکی سلول گزارش شده است، اما هنوز ابهاماتی زیادی در این فرایندها وجود دارد (۱۲ و۱۱). یکی از مکانیسم‌هایی که PlGF ممکن است مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی را القا کند تنظیم بیان پروتئین‌های MMP می‌باشد. همانطور که در شکل

۱ نشان داده شد، فعالیت MMP های ۲و۹ بصورت خیلی قوی در سلول‌های AGC مشاهده شد. بنابراین ممکن است نقش PlGF در مهاجرت سلول‌های AGC با تحریک فعالیت MMP-2,-9 باشد. با توجه به این تحقیق، می توان نتیجه گرفت که اثر مهاریPlGF-siRNA، ۲۴ ساعت در سلول‌ها پایداری دارد، پس از این زمان، یعنی در بازه زمانی ۴۸ ساعت (با تکنیک زایموگرافی بیان MMP-2 در غلظت ۲۰ پیکومول siRNA تایید شد) اثر مهاری siRNA کاهش می یابد و با توجه به دوز غلظت مهار کننده، بیان MMP-2,-9 نیز کاهش می یابد. بنابراین می توان به این نتیجه رسید که مهار PlGF وابسته به غلظت و زمان مورد استفاده می‌باشد. Shu-Chen Wei و همکاران سلول‌های سرطان کلورکتال (CRC) را با PlGF تیمار دادند و در نتیجه افزایش مهاجرت سلولی را با افزایش فعالیت آنزیم‌های MMP های ۲و۹ نشان دادند. در این مطالعه تیمار سلول‌های مورد نظر با PlGF منجر به فسفریلاسیون p38 در مسیر سیگنالی p38MAPK گردید پس نتیجه‌ی این تحقیق آنها اثبات می‌کند که PlGF با تاثیر بر فعالیت MMP های ۲و۹ بعنوان سوبستراهای پائین دست این مسیر سیگنالی باعث القای مهاجرت سلولیCRC می شود. نتایج این تحقیق مشابه مطالعه حاضر است (۱۳). در تحقیق دیگری Marcella Marcellini و همکاران انجام گرفت، سلول‌های ملانومای B16-BL6 در موش را با ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر PlGF تیمار نمودند و پس از ۲۴ ساعت از تیمار با تکنیک زایموگرافی افزایش فعالیت آنزیم‌های MMP-2,-9 را مشاهده نمودند (۱۴). مطالعه حاضر و آزمایشهای Shu-Chen Wei، Marcella Marcellini و همکاران، هم از نظر لاین‌های سلولی استفاده شده، و هم از نظر نوع تیمار بکار برده شده متفاوت می‌باشند ولی نتایج این مطالعات حاکی از این است که PlGF با تاثیر بر فعالیت MMP های ۲و۹ بر مهاجرت سلولی نقش مهمی دارد. و همچنین در تحقیق دیگری Martha Lappas با تزریق PlGF به بافت پلاستای انسانی متوجه افزایش فعالیت MMP-9 در این بافت شدند (۱۵). نتیجه تحقیق حاضر با این مطالعه در تاثیر PlGF بر آنزیم های متالوپروتئینازها مشابه می باشد و تفاوت را شاید در اینکه بافت جفتی سرطانی نمی‌باشد دانست.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات گذشته، می توان اظهار داشت که فاکتور رشد، PlGF ممکن است در متاستاز سلول-های سرطانی از طریق تاثیر بر پروتئین‌های9- وMMP-2 نقش داشته باشد.

پیشنهادات

به این ترتیب در مطالعات آینده برای نتیجه گیری بهتر می توان این مطالعه را با لاین های سلولی دیگر نیز انجام داد. از تیمار با PlGF برای مقایسه با نتایج siRNA علیه PlGF در لاین سلولی AGC استفاده شود و تاثیر افزایش ژن PlGF در محیط سلولی AGC بررسی شود.

تشکر وقدردانی

در پایان از زحمات خانم سمیه هواسی و فاطمه محمودی در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی و مولکولی دانشگاه رازی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند صمیمانه تشکر می شود.

References

1. Aragon-Ching JB, Zujewski J. CNS metastasis: an old problem in a new guise. *Clinical Cancer Research* 2007; **13**(6): 1644–1647.
2. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, et.al. "Activation of Progelatinase a (Mmp-2) by Neutrophil Elastase, Cathepsin G, and Proteinase-3: A Role for Inflammatory Cells in Tumor Invasion and Angiogenesis." *J Cell Physiol* 2001; **2**: 197-206.
3. Shahverdi AR, Saadat F, Khorramizadeh MR, Iranshahi M, Khoshayand MR. Two matrix metalloproteinase inhibitors from Ferula persica var. persica. *Phytomedicine* 2006; **13**(9-10): 712-717.
4. Van Doren SR, Kurochkin AV, Hu W, Ye QZ, Johnson LL, Hupe DJ, et.al. Solution structure of the catalytic domain of human stromelysin complexed with a hydrophobic inhibitor. *Protein Sci* 1995; **4**(12): 2487-2498.
5. Kazuki Mizutani, Kikuo Kofuji, Kazuo Shirouzu. The significance of MMP-1 and MMP-2 in peritoneal disseminated metastasis of gastric cancer. *July* 2000; **30**(7): 614-621.
6. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. "Isolation of a Human Placenta Cdna Coding for a Protein Related to the Vascular Permeability Factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(20): 9267-9271.
7. Davis-Smyth T, Presta LG, Ferrara N. "Mapping the Charged Residues in the Second Immunoglobulin-Like Domain of the Vascular Endothelial Growth Factor/Placenta Growth Factor Receptor Flt-1 Required for Binding and Structural Stability." *J Biol Chem* 1998; **273**(6): 3216-3222.
8. Taylor AP, Leon E, Goldenberg Dm. Placental growth factor (PlGF) enhances breast cancer cell motility by mobilising ERK1/2 phosphorylation and cytoskeletal rearrangement. *British Journal of Cancer* 2010; **103**: 82-89.
9. Eriksson Ulf, Alitalo KariI. VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. *Nature Medicine* 2002; **8**: 831–840.
10. Sharifi A, AminzadehM, Akrami H, Rahbani Nobar M, Havasi S. Metastasis Inhibition through Down Regulation of PlGF in Gastric Adenocarcinoma (AGC) Cells. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Science and Health Service* 2013; **35**: 54-59.
11. Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, et.al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2559-2567.
12. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, et.al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997; **76**: 517–531.
13. Shu-Chen Wei, Po-Nien Tsao, Meng-Tzu Weng, Zhifang Cao, Jau-Min Wong. Flt-1 in colorectal cancer cells is required for the tumor invasive effect of placental growth factor through a p38-MMP9 pathway. *Journal of Biomedical Science* 2013; **20**: 39.
14. Marcellini M, De Luca N, Riccioni T, Ciucci A, Orecchia A, Lacal P, et.al. "Increased Melanoma Growth and Metastasis Spreading in Mice Overexpressing Placenta Growth Factor." *Am J Pathol* 2006; **169**(2): 643-654.
15. Martha Lappa. Nuclear factor-kB mediates placental growth factor induced pro-labour mediators in human placenta. *Molecular Human Reproduction* 2012; **18**: 354–361.