Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Editing of the MALAT1 Gene in MDA-MB-361 Breast Cancer Cell Line using the Novel CRISPR Method

Soraya Ahmadi-Baloutaki[1], Abbas Doosti[2*], Mojtaba Jafarinia[3], Hamed Reza Goodarzi[1]

[1] Dept of Genetic, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
[2] Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Dept of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 01 July 2021
Revised: 19 November 2021
Accepted: 18 December 2021
Published Online: 23 May 2022

**** Correspondence to:***
Abbas Doosti
Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email: abbasdoosti@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: Long non-coding RNAs play an important role in regulating gene expression, RNA processing, histone modification, and rearrangement of chromatin genes. These molecules can also be involved in many biological processes, such as organogenesis, cell differentiation, development, genome imprinting, quantitative compensation, and tumorigenesis. High expression of MALAT1 (a type of lncRNA) in many cancers, including breast cancer, indicates that a disorder of MALAT1 regulation is an important factor in the development of many types of cancer. Breast cancer is the most common cancer among women worldwide, and the invasion, as well as metastasis of this disease, are considered among the main causes of death. The present study aimed to knock out the MALAT1 gene in the MDA-MB-361 breast cancer cell line and evaluate its function and effects on the expression of genes associated with apoptosis.

Material & Methods: In this study, two types of sgRNA were designed by CHOPCHOP software for exon 1 of the MALAT1 gene. These sgRNAs were cloned separately into two CRISPR vectors to generate the recombinant vectors PX459-sgRNA1 and PX459-sgRNA2. Co-transfection of these two recombinant vectors into the MDA-MB-361 cancer cell line was performed using lipofectamine 2000. MALAT1 gene editing was investigated in the cells receiving recombinant vectors. The expression of genes related to apoptosis was analyzed by Real-Time PCR. Cell proliferation and apoptosis were assessed by MTT and flow cytometry methods, respectively.
(Ethic code: IR.IAU.M.REC.1399.010)

Findings: The MALAT1 gene was edited by the CRISPR method in MDA-MB-361 cells. The rate of cell proliferation in the cells of the treatment group, compared to the control groups, showed a significant decrease ($P<0.05$). Apoptosis levels were significantly increased in cancer cells the MALAT1 gene of which had been deleted. Moreover, the expression of BCL2 and survivin anti-apoptotic genes in treated (edited) cells was significantly reduced, compared to control cells ($P<0.05$). Increased expression of proapoptotic genes P53, BAK, BAX, and FAS was also observed in the edited cells ($P<0.05$).

Discussion & Conclusion: The results of this study confirm that the deletion of the MALAT1 gene has a significant effect on increasing apoptosis and reducing cell proliferation. A reduction in the expression of the MALAT1 gene can prevent the growth and proliferation of breast cancer cell lines. Therefore, it seems that the control of MALAT1 oncogene expression is useful and effective for controlling tumors.

Keywords: Apoptosis, Breast cancer cell line, CRISPR, MALAT1

➢ **How to cite this paper**

Ahmadi-Baloutaki S, Doosti A, Jafarinia M, Goodarzi HR. Editing of the MALAT1 Gene in MDA-MB-361 Breast Cancer Cell Line using the Novel CRISPR Method. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(2): 18-31.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences: Volume 30, Issue 2, 2022

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

ویرایش ژن MALAT1 در ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 با روش نوین کریسپر

ثریا احمدی بلوطکی[۱]، عباس دوستی[۲*]، مجتبی جعفری‌نیا[۳]، حامدرضا گودرزی[۱]

[۱] گروه ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
[۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۳] گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲

نویسنده مسئول:
عباس دوستی
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
Email:
abbasdoosti@yahoo.com

چکیده

مقدمه: RNAهای غیرکدکنندهٔ بلند به‌طور فعال نقش مهمی در تنظیم بیان ژن، پردازش RNA، اصلاح هیستون و بازآرایی ژن‌های کروماتین ایفا می‌کنند؛ همچنین این مولکول‌ها می‌توانند در فرایندهای زیست‌شناختی متنوع ازجمله اندام‌زایی، تمایز سلولی، نمو طبیعی، نقش‌پذیری ژنوم، جبران مقدار و روند تومورزایی دخیل باشند. بیان بالای MALAT1 (نوعی lncRNA) در بسیاری از سرطان‌ها، ازجمله سرطان سینه نشان می‌دهد که اختلال تنظیم MALAT1 در رشد بسیاری از انواع سرطان‌ها عامل مهمی به‌شمار می‌رود. سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در میان زنان در سراسر جهان است و تهاجم و متاستاز این بیماری از علل اصلی مرگ‌ومیر مرتبط با آن است. هدف از مطالعهٔ حاضر، حذف ژن MALAT1 در ردهٔ سلولی MDA-MB-361 سرطان سینه و ارزیابی عملکرد و تأثیرات آن روی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، دو نوع sgRNA توسط نرم‌افزار CHOPCHOP برای اگزون شمارهٔ ۱ ژن MALAT1 طراحی شد. این sgRNAها در دو وکتور کریسپری به‌صورت جداگانه کلون گردیدند تا وکتورهای نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به وجود آیند. انتقال همزمان این دو وکتور به ردهٔ سلول‌های سرطانی MDA-MB-361 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ صورت گرفت. ویرایش ژن MALAT1 در سلول‌های دریافت‌کنندهٔ وکتورهای کریسپری بررسی شد. میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز به روش real time PCR آنالیز گردید. میزان تکثیر سلولی و آپوپتوز به‌ترتیب با روش‌های MTT و فلوسیتومتری ارزیابی شد.

یافته‌ها: ویرایش ژن MALAT1 به روش کریسپر در سلول‌های MDA-MB-361 صورت گرفت. میزان تکثیر سلولی در سلول‌های گروه تیمار نسبت به گروه‌های کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). سطح آپوپتوز در سلول‌های سرطانی که ژن MALAT1 آن‌ها حذف گردیده است، با افزایش چشمگیری همراه بود؛ همچنین بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی BCL2 و survivin در سلول‌های تحت تیمار (ویرایش‌شده) نسبت به سلول‌های گروه کنترل، به‌صورت معناداری کاهش یافت ($P<0.05$). افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی P53، BAK، BAX و FAS نیز در سلول‌های ویرایش‌شده مشاهده گردید ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه تأیید می‌کند که حذف ژن MALAT1 در افزایش آپوپتوز و کاهش تکثیر سلولی تأثیر بسزایی دارد و کاهش بیان ژن MALAT1 می‌تواند از رشد و تکثیر ردهٔ سلول سرطان سینه جلوگیری کند؛ بنابراین، به‌نظر می‌رسد کنترل بیان انکوژن MALAT1 برای کنترل تومورها مفید و مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: MALAT1، ردهٔ سلولی سرطان سینه، کریسپر، آپوپتوز

استناد: احمدی بلوطکی، ثریا؛ دوستی، عباس؛ جعفری نیا، مجتبی؛ گودرزی، حامدرضا. ویرایش ژن MALAT1 در ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 با روش نوین کریسپر. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، تیر ۱۴۰۱؛۳۰(۲): ۳۱-۱۸.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در میان زنان در سراسر جهان است. در میان سایر سرطان‌ها، این سرطان به‌عنوان پنجمین عامل مرگ‌ومیر شناخته می‌شود (۱)؛ همچنین ۱۵ درصد از کل مرگ‌ومیر در میان زنان ناشی از سرطان سینه است. شیوع سرطان سینه در کشورهای پیشرفته بیشتر از کشورهای درحال‌توسعه است، هرچند این سرطان در کشورهای درحال‌توسعه نیز رو به افزایش است (۲). در ایران، سرطان سینه ۲۴/۴ درصد بدخیمی‌ها را به خود اختصاص داده است و رتبهٔ اول ابتلا به سرطان را در میان زنان دارد. تشخیص زودهنگام و به‌موقع این سرطان نقش مهمی در بهبود بیماران و کاهش میزان مرگ‌ومیر را در پی خواهد داشت (۳). عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی در بروز سرطان دخالت دارند. ازجمله عواملی که در بروز یا پیشگیری از سرطان نقش مهمی ایفا می‌کنند، RNAهای غیرکدکنندهٔ بلند (long non-coding RNAs: lncRNAs) هستند که هیچ پروتئینی را کد نمی‌کنند (۴). RNAهای غیرکدکنندهٔ بلند رونوشت‌های غیر رمزگذار با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که بیشتر در هستهٔ سلول قرار دارند (۵). عملکردهای عمدهٔ lncRNA ها عبارت‌اند از: مشارکت در بازآرایی ژنوم، تنظیم رونویسی، تثبیت mRNA و همچنین در فرایندهای زیستی دیگر مثل سرطان‌زایی، آپوپتوز، چرخهٔ سلولی، تکوین، تمایز، تنظیم اپی‌ژنتیک، تهاجم و متاستاز نقش اساسی بازی می‌کنند (۷، ۶). اگرچه lncRNAها نمی‌توانند پروتئین‌ها را رمزگذاری کنند؛ اما نقش آن‌ها در فرایندهای سلولی بسیار ضروری و پیچیده است. این مولکول‌ها با پروتئین‌های متصل‌شونده به RNA برهم‌کنش دارند و قادر به فعال‌سازی هم‌زمان عوامل رونویسی یا سرکوب پروموترهای ژن‌های هدف هستند که به تنظیم فرایند رونویسی منجر می‌شود (۸). از نظر مولکولی، lncRNAها به ۵ گروه طبقه‌بندی می‌شوند که شامل lncRNAهای بین‌ژنی، اینترونی، سنس، آنتی‌سنس و دوطرفه (bidirectional) هستند. مسیرهای متاستاتیک با بیان نامناسب lncRNAها ارتباط بسیاری دارند، به‌طوری‌که این مولکول‌ها با فعال کردن یا مهار مسیرهای متاستاتیک، در ایجاد یا مهار سرطان‌های مختلف و توسعهٔ متاستاز نقش مهمی ایفا می‌کنند (۹).

یکی از lncRNA های مؤثر در بروز سرطان، MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) نام دارد. MALAT1 نوعی RNA غیرکدکنندهٔ بلند بین‌ژنی است که بیش از ۸۰۰۰ نوکلئوتید دارد. مکان آن در ژنوم انسان روی بازوی بلند کروموزوم شمارهٔ ۱۱ (11q13) انسان است. ساختار این lncRNA در میان گونه‌های مختلف سینه‌داران بسیار حفاظت‌شده است. MALAT1 ابتدا به‌عنوان یک نشانگر برای تشخیص مراحل اولیهٔ بروز سرطان ریه شناسایی شد (۱۰، ۹). مطالعات نشان داده‌اند که بیان بیش‌ازحد MALAT1 در سرطان‌های مختلف مشاهده‌شده است (۱۲، ۱۱)، به‌طوری‌که بیان بالای آن با تومورزایی و پیشرفت سرطان همراه است و در بروز متاستاز نقش دارد (۱۵-۱۳). بیان بالای MALAT1 در سرطان سینه نیز دیده‌شده است. درواقع، این افزایش بیان سبب تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی سینه می‌گردد؛ به همین علت، MALAT1 در سرطان سینه به‌عنوان یک عامل خطرساز و قابل‌توجه مطرح است (۱۶). MALAT1 به‌عنوان عامل تنظیم‌کنندهٔ رونویسی برای ژن‌های درگیر در متاستاز سرطان سینه و مهاجرت سلولی شناخته می‌شود و در تنظیم چرخهٔ سلولی نیز نقش دارد (۱۷)؛ بنابراین، سرکوب بیان MALAT1 می‌تواند از تهاجم و متاستاز سرطان سینه جلوگیری کند (۱۹، ۱۸). ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 یکی از سلول‌های سرطانی بدخیم است که در تحقیقات مختلف در زمینهٔ سرطان استفاده می‌شود. این سلول اولین بار از یک زن ۴۰ سالهٔ قفقازی مبتلا به آدنوکارسینومای سینه جداسازی شد (۲۰). یکی از راه‌های نوین برای دست‌کاری و ویرایش ژنوم موجودات زنده سامانهٔ CRISPR/cas9 است. امروزه، از فن CRISPR/cas9 برای افزودن یا حذف ژن‌ها در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها و سلول‌ها، استفاده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

می‌شود، به‌طوری‌که از آن می‌توان برای حذف هر منطقهٔ ژنومی با دقت بسیار بالا استفاده کرد. در سال‌های اخیر، از فن کریسپر برای درمان سرطان‌ها، بیماری‌های عصبی، بیماری‌های ارثی و بیماری‌های قلبی و عروقی کمک گرفته‌شده است (۲۲، ۲۱). در سال ۲۰۱۳ میلادی، برای اولین بار تکنیک CRISPR/cas9، برای ویرایش ژنوم سلول‌های سینه‌داران به‌کاربرده شد. اخیراً با توسعهٔ تکنیک کریسپر، دست‌کاری و مهندسی ژنوم سلول‌ها توسعه و تسریع یافته است (۲۳). هدف از این تحقیق، مطالعه و بررسی آثار حذف ژن MALAT1 مؤثر در بروز سرطان با تکنیک نوین ویرایش ژنی CRISPR/Cas9 در ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 است.

مواد و روش ها

طراحی سامانهٔ CRISPR/Cas9 اختصاصی: در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی، یک سامانهٔ ویرایش ژنی تخصصی با استفاده از فن کریسپر طراحی شد تا بخش نسبتاً بزرگی از اگزون شمارهٔ ۱ ژن MALAT1 از ژنوم ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 حذف گردد. به این منظور، دو RNA راهنما (sgRNA یا Single guide RNA) با استفاده از نرم‌افزار آنلاین CHOPCHOP طراحی شد. توالی نوکلئوتیدی RNA راهنمای اول به نام sgRNA1 شامل ACTTCTCAACCGTCCCTGCA و توالی نوکلئوتیدی sgRNA2 به‌صورت AGGTT TCTAAAACATGACGG است. با کاربرد این دو RNA راهنما در سلول، ناحیهٔ میان آن‌ها که شامل بخش بزرگی از اگزون شمارهٔ ۱ ژن MALAT1 می‌شود، از کروموزوم شمارهٔ ۱۱ سلول انسانی حذف می‌گردد؛ به عبارت ساده‌تر، در این پژوهش، ژنوم سلول MDA-MB-361 به‌گونه‌ای با فن کریسپر ویرایش می‌گردد که قادر به تولید محصولات ژن MALAT1 نخواهد بود.

دو توالی RNA راهنما که در بالا اشاره شد، به‌صورت مجزا در وکتور کریسپری pSCas9(BB)-2A-Puor V2.0 (PX459) (Addgene, USA)، کلون‌سازی شدند؛ بنابراین، دو وکتور نوترکیب تخصصی برای ویرایش ژنوم سلول ایجاد گردید که در این تحقیق با نام‌های PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 خوانده می‌شوند. تأیید صحت وکتورهای نوترکیب حاصل با انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی hU6-F و sgR1-R برای وکتور نوترکیب PX459-sgRNA1 و پرایمرهای hU6-F و sgR2-R برای وکتور نوترکیب PX459-sgRNA2 صورت گرفت. پرایمر فوروارد از روی پروموتر hU6 درون وکتور و پرایمر ریورس از روی ناحیهٔ مکمل sgRNA کلون‌شده طراحی گردید. با توجه به اینکه اندازه هر دو sgRNA دقیقاً با یکدیگر مساوی و برابر ۲۰ نوکلئوتید است؛ بنابراین، طول محصول PCR روی هر دو وکتور نوترکیب، به‌اندازهٔ ۲۷۶ جفت باز است. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این مرحله در جدول شمارهٔ ۱ آمده است. وکتورهای ایجادشده علاوه بر حمل RNAهای راهنما، امکان تولید آنزیم اندونوکلئازی Cas9 را دارند. این آنزیم برش‌های لازم را در محل اتصال RNAهای راهنما روی ژنوم سلول هدف ایجاد می‌کند. از وکتور PX459-GFP که حامل ژن GFP و بدون هرگونه RNA راهنماست، به‌عنوان کنترل در آزمایش‌ها استفاده شد.

ویرایش ژنوم سلول سرطانی: ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. سلول‌های مذکور در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco، آمریکا) غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و همراه با ۱ درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند. شرایط رشد و نگهداری سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، دارای ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت بود. برای ویرایش ژنوم سلول سرطانی MDA-MB-361 لازم است دو پلاسمید نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به درون سلول منتقل شوند. برای انتقال این پلاسمیدها، از روش استاندارد ترانسفکشن با کاربرد لیپوزوم بهره گرفته شد. به این منظور، از محلول لیپوفکتامین

۲۰۰۰ (ترموفیشر، آمریکا)، استفاده گردید، به‌طوری‌که ابتدا سلول‌های سرطانی در ۳ خانه از یک پلیت ۶ خانهٔ مخصوص کشت سلول، به تعداد ۳۰۰ هزار سلول به ازای هر خانه کشت داده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفتند؛ سپس محیط کشت روی سلول‌ها با محیط کشت تازهٔ بدون FBS تعویض گردید و مخلوط لیپوفکشن در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین، ۲ میکروگرم پلاسمید به همراه محیط کشت RPMI، به‌صورت قطره‌قطره به کشت سلولی افزوده شد. گروه‌بندی سلول‌ها به این صورت است که به خانهٔ اول، هر دو پلاسمید PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 (گروه تیمار) و به خانهٔ دوم پلاسمید PX459-GFP اضافه گردید (گروه پلاسمید خالی) و گروه سوم شامل خانه‌ای است که تنها حاوی سلول‌های کشت‌شده بدون هرگونه تیمار است (گروه بدون پلاسمید). پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت روی سلول‌ها با محیط تازه دارای آنتی‌بیوتیک پوروماسین (۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) تعویض شد. نشانگر انتخابی وکتور کریسپری PX459، مقاومت نسبت به پوروماسین است و سلول‌های دریافت‌کنندهٔ وکتور کریسپری در حضور پوروماسین زنده می‌مانند.

بررسی صحت عملکرد سامانهٔ کریسپر: در صورت اتصال دو RNA راهنمای sgRNA1 و sgRNA2 به نواحی مکمل خود روی اگزون شمارهٔ ۱ ژن MALAT1 در سلول سرطانی MDA-MB-361، آنزیم برش‌دهندهٔ Cas9 موجب ایجاد شکاف در این نواحی خواهد شد. حاصل این فرایند، حذف بخش بزرگی از ژن MALAT1 و ناک اوت کردن آن است. با علم به اینکه ساختار کروموزومی سلول‌های یوکاریوت به‌صورت دیپلوئید (2n) است؛ بنابراین، پس از تأثیر سامانهٔ ویرایش ژنوم کریسپر ممکن است یک آلل یا هر دو آلل ژن MALAT1 در سلول‌های سرطانی حذف گردد. برای یافتن سلول‌هایی که هر دو آلل ژن یادشده در آن‌ها حذف گردیده، از سامانهٔ انتخاب کلون‌های تک‌سلولی استفاده شد؛ یعنی از میان سلول‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک پوروماسین که نشان‌دهندهٔ دریافت وکتورهای نوترکیب است، رقت‌سازی‌های متوالی در پلیت ۹۶ خانهٔ استریل صورت گرفت؛ سپس ۴۸ ساعت به سلول‌ها اجازهٔ رشد در شرایط انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد داده شد. از رقت‌های آخر که شانس رشد تک کلون در آن‌ها بیشتر است، نمونه‌برداری صورت گرفت.

سپس برای بررسی این ناحیهٔ حذف‌شده، از روش PCR با کمک پرایمرهای مخصوص ژن MALAT1 (جدول شمارهٔ ۱) استفاده گردید؛ بنابراین، ابتدا از سلول‌های دست‌کاری‌شده (گروه تیمار و گروه کنترل) با استفاده از کیت استخراج DNA سیناکلون (ایران)، ژنوم کامل سلول تخلیص شد؛ سپس کیفیت و غلظت DNA تخلیص‌شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ (ترموفیشر، آمریکا) ارزیابی گردید و پس از آن، واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس PCR 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۰۳ نانومول از هریک از پرایمرهای رفت‌وبرگشت (جدول شمارهٔ ۱)، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA سلول و با افزودن آب مقطر، در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت؛ سپس مخلوط واکنش‌گرها در دستگاه PCR (اپندرف، آلمان) با برنامهٔ دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در شرایط ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ مرحلهٔ پیاپی به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در یک مرحله با دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردیدند و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، تصویربرداری از ژل با دستگاه UVI tech (انگلستان) صورت پذیرفت.

با انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی MALAT1-F و MALAT1-R روی ژنوم سلول‌های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

دست‌کاری نشده یا سلول‌های گروه کنترل (پلاسمید خالی)، محصولی به‌اندازهٔ ۱۱۶۲ جفت باز پدید می‌آید. در صورت صحت عملکرد این سامانهٔ کریسپری خاص، روی ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 ویرایش شده، یک قطعهٔ ۶۹۱ جفت بازی حذف می‌شود؛ بنابراین، در این‌گونه سلول‌ها، یک محصول PCR کوتاه به‌اندازهٔ ۴۷۱ جفت باز حاصل می‌گردد. بدین منظور، مشاهدهٔ قطعات ۱۱۶۲ و ۴۷۱ جفت بازی روی ژل آگارز، به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ ژن سالم MALAT1 و ژن ویرایش‌شده (ناک اوت) MALAT1 خواهد بود؛ بنابراین، دربارهٔ این سلول‌ها پس از دست‌کاری ژنتیکی، سه حالت ممکن است اتفاق بیفتد: در یک گروه ممکن است هر دو آلل MALAT1 دچار حذف شوند و تنها یک باند کوتاه ۴۷۱ جفت بازی مشاهده شود (MALAT1-/MALAT1-)، در گروه دوم ممکن است یک آلل ناک اوت شود و آلل دیگر به‌صورت طبیعی باقی بماند؛ بنابراین، دو باند ۱۱۶۲ و ۴۷۱ جفت بازی هر دو به وجود می‌آید (MALAT1+/MALAT1-) و در گروه سوم که ممکن است هیچ‌یک از آلل‌ها ناک اوت نشده باشند، تنها یک باند بزرگ ۱۱۶۲ تشکیل می‌گردد (MALAT1+/MALAT1+).

تخلیص RNA و تهیهٔ DNA مکمل: از سلول‌های گروه تیمار (حذف‌ژن‌شده) و سلول‌های گروه کنترل با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون (محلول RNX-Plus)، بر اساس دستورالعمل کیت، تخلیص RNA کل سلول صورت گرفت. کیفیت و غلظت RNAهای جداشده با کمک روش اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ (ترموفیشر، آمریکا) ارزیابی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران)، بر اساس روش کار کیت انجام گردید.

بررسی تغییرات بیان ژن‌ها: در این مرحله، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی در ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 تیمارشده (ویرایش‌ژنوم‌شده) در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل سنجیده شد. به این منظور، ژن‌های P53، BAK، BAX، FAS، BCL2 و survivin به روش کمی real time PCR بررسی گردیدند. در هر مرحله از آزمایش، از ژن خانه‌داری GAPDH به‌عنوان ژن رفرنس برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

مخلوط واکنشگرها شامل ۷/۵ میکرولیتر از مستر میکس SYBR 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۰۳ نانومول از هریک از پرایمرهای فوروارد و ریورس (جدول شمارهٔ ۱)، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از cDNA و با افزودن آب مقطر، در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر تهیه شد. برنامهٔ دمایی در دستگاه real time PCR (کیاژن، آلمان) تنظیم گردید. مراحل برنامهٔ دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، در ادامه ۴۰ مرحلهٔ پیاپی به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، مرحلهٔ اتصال پرایمرها بر اساس جدول شمارهٔ ۱ به مدت ۱۵ ثانیه و مرحلهٔ تکثیر در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه اجرا گردید.

درنهایت، به‌منظور آنالیز منحنی ذوب، دمای دستگاه بین ۶۵ تا ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد با طیف افزایش دمایی ۱ درجهٔ سانتی‌گراد در هر ثانیه تنظیم شد. داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن‌های یادشده، با نرم‌افزار Rotor Gene 6000 در دستگاه real time PCR و به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ آنالیز و مقایسه گردیدند.

سنجش میزان تکثیر سلول‌ها به روش MTT: میزان تکثیر سلولی در ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 تیمارشده (ناک اوت) در مقایسه با گروه‌های کنترل (گروه پلاسمید خالی و گروه بدون پلاسمید)، با روش متیل تیازول تترازولیوم (Methyl Thiazol Tetrazolium) یا MTT بررسی شد. به این منظور، از کیت Cell Proliferation Kit 1 (Roche، آلمان) استفاده گردید. در این آزمایش، سلول‌ها در پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از رشد سلول‌ها، محیط کشت روی سلول‌ها خارج گردید و دو بار با PBS شستشو صورت گرفت؛ سپس به هر خانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI بدون PBS به‌همراه ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

جدول شمارهٔ ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این تحقیق

ژن	نام پرایمرها	توالی پرایمر 5'----------3'	دمای اتصال	اندازهٔ محصول PCR (bp)
MALAT1	MALAT1-F MALAT1-R	AGCTCTGTGGTGTGGGATTGAG CGTTAACTAGGCTTTAAATGACGCAATTC	۶۲	۴۷۱
PX549-sgRAN1	hU6-F sgR1-R	GAGGGCCTATTTCCCATGATT AAGACCTGCAGGGACGGTTG	۶۲	۲۷۶
PX549-sgRAN2	hU6-F sgR2-R	GAGGGCCTATTTCCCATGATT AAGACCCCGTCATGTTTTAG	۶۲	۲۷۶
P53	P53-F P53-R	TGCGTGTGGAGTATTTGGATGAC CAGTGTGATGATGGTGAGGATGG	۶۴	۱۷۰
BCL2	BCL2-F BCL2-R	GACGACTTCTCCCGCCGCTAC CGGTTCAGGTACTCAGTCATCACCAC	۶۵	۲۴۵
FAS	FAS-F FAS-R	CAATTCTGCCATAAGCCCTGTC GTCCTTCATCACACAATCTACATCTTC	۶۴	۱۶۳
BAX	BAX-F BAX-R	AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG	۶۵	۲۴۳
BAK	BAK-F BAK-R	CGTTTTTTACCGCCATCAGCAG ATAGCGTCGGTTGATGTCGTCC	۶۶	۱۵۴
survivin	Surv-F Surv-R	AGAACTGGCCCTTGGAGG CTTTTTATGTTCCTCTATGGGGTC	۶۴	۱۷۰
GAPDH	GDH-F GDH-R	GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC GGTCACGAGTCCTTCCACGATAC	۶۴	۱۸۳

از متیل تیازول تترازولیوم افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید؛ سپس محلول روی سلول‌ها خارج و مقدار ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه گردید و ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. درنهایت، تکثیر سلولی در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر و با استفاده از اندازه‌گیری میزان جذب نور، توسط دستگاه ELISA Reader (BioTek, U.S.A) تعیین گردید.

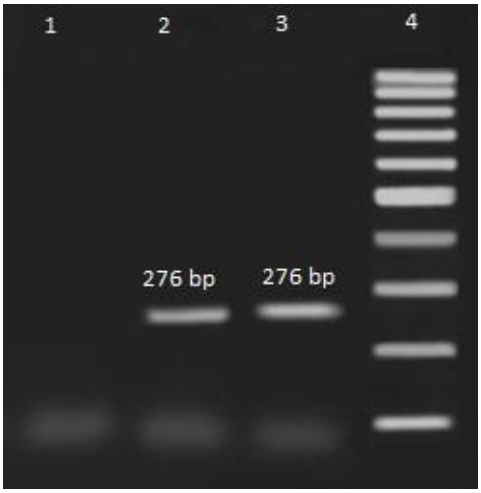
سنجش فلوسیتومتری: برای تعیین میزان در سلول‌های گروه‌های تحت تیمار با سامانهٔ کریسپری و سلول‌های کنترل، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. درواقع، آپوپتوز به کمکAnnexin V کونژوگه با فلوئوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) و نکروز با PI (Propidium Iodide) سنجش می‌گردد. به این منظور، از کیت Annexin-V-FITC / Propidium iodide Mab Taq استفاده شد. به‌طور خلاصه، تعداد یک میلیون از هریک از گروه‌های سلولی (گروه‌های تیمار و کنترل) در ۱ میلی‌لیتر از بافر 1X به نام Annexin-V binding buffer به‌صورت سوسپانسیون درآمد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شد و ۵ میکرولیتر از محلول FITC Annexin V و ۵ میکرولیتر از محلول PI به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها در تاریکی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. درنهایت، لوله‌های حاوی سلول توسط دستگاه فلوسیتومتری بررسی گردیدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری: همهٔ اطلاعات و داده‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار SPSS vol.20 وارد و تفاوت میان گروه‌ها با آزمون آماری t-student محاسبه شد. با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism vol.5.01 نمودارها تهیه گردید. از نظر آماری $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تأیید صحت وکتورهای کریسپری نوترکیب: پس از طراحی RNAهای راهنما، توالی‌های sgRNA1 و sgRNA2 به‌صورت جداگانه در دو وکتور کریسپری کلون گردیدند. نتیجهٔ کلون‌سازی این قطعات ژنی، سبب تشکیل وکتورهای کریسپری نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 شد. با به‌کارگیری روش PCR مشخص گردید که RNAهای راهنما با موفقیت در محل صحیح خود در هریک از وکتورها درج شده‌اند. محصول PCR به‌اندازهٔ ۲۷۶ جفت باز نشان‌دهندهٔ حضور هریک از sgRNAها در وکتور مربوطه هستند (شکل شمارهٔ ۱).

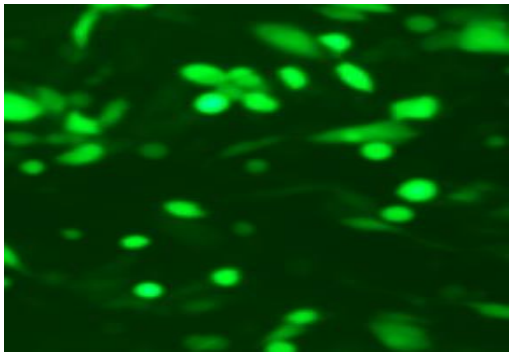
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]



شکل شمارهٔ ۱. واکنش PCR برای تأیید حضور sgRNAها در وکتورهای نوترکیب کریسپری. شمارهٔ ۱، کنترل منفی PCR (بدون DNA)؛ شماره‌های ۲ و ۳، تشکیل باند ۲۷۶ جفت بازی به‌ترتیب برای هریک از پلاسمیدهای نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2؛ شمارهٔ ۴، نشانگر DNA از نوع ۱۰۰ جفت بازی.

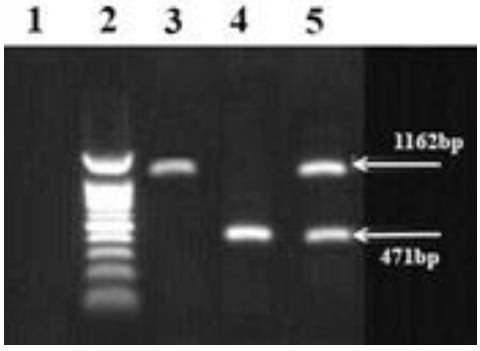
تأیید صحت لیپوفکشن: وکتورهای نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به‌طور هم‌زمان و به روش لیپوفکشن به سلول‌های ردهٔ سرطان سینه MDA-MB-361 منتقل شدند (گروه تیمار). در شرایط کاملاً مشابه، وکتور PX459-GFP نیز به گروه دیگری از همین سلول‌ها، به‌عنوان گروه کنترل، منتقل گردید (گروه پلاسمید خالی). مشاهدهٔ میکروسکوپی سلول‌های دریافت‌کنندهٔ GFP نشان‌دهندهٔ رنگ سبز فلورسنت بود که صحت انتقال وکتورها به سلول‌های هدف را تأیید می‌کند. نتایج مدنظر در شکل شمارهٔ ۲ قابل‌مشاهده است.

نتیجهٔ ویرایش ژن در سلول‌های سرطانی: ترانسفکشن همزمان دو وکتور نوترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به ردهٔ سلولی MDA-MB-361، باعث حذف قطعهٔ بزرگی از ژن MALAT1 از درون ژنوم این سلول‌ها می‌گردد. درصورتی‌که عملکرد دو sgRNAدر منطقهٔ هدف به‌درستی انجام‌شده باشد، قطعه‌ای به‌اندازهٔ ۶۹۱ جفت باز حذف می‌شود. انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی MALAT1-Fو MALAT1-R، روی ژنوم سلول‌های گروه تیمار و گروه‌های کنترل، محصولات PCR متفاوتی را ایجاد می‌کند. یافته‌ها نشان‌دهندهٔ تشکیل



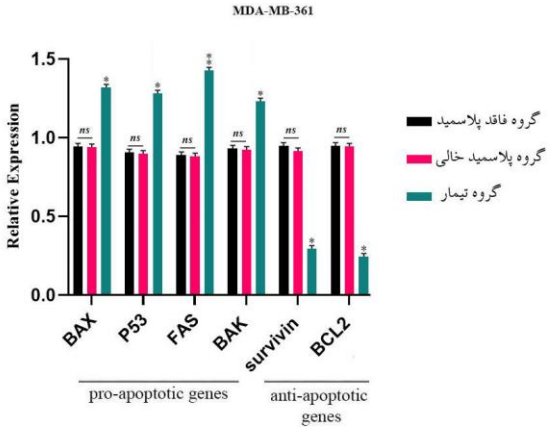
شکل شمارهٔ ۲. ترانسفکشن ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 توسط وکتور PX459-GFP. مشاهدهٔ رنگ سبز فلورسنت در سلول‌های ترانسفکت‌شده تأییدکنندهٔ صحت انتقال وکتورها به ردهٔ سلول‌های MDA-MB-361 است.

باند ۱۱۶۲جفت بازی برای گروه کنترل (بدون حذف ژن) و تشکیل باند تقریبی به‌اندازهٔ ۴۷۱ جفت بازی برای گروه تیمار است؛ به‌عبارت‌دیگر، در سلول‌های نرمال (بدون ویرایش ژن)، محصول PCR به‌اندازهٔ ۱۱۶۲ جفت باز است؛ بنابراین، با حذف قطعهٔ ۶۹۱ جفت بازی، مقدار باقی‌مانده شامل قطعه‌ای به طول حدود ۴۷۱ جفت باز است (شکل شمارهٔ ۳). بر اساس این، حذف بخش بزرگی از اگزون شمارهٔ ۱ ژن MALAT1، با فن نوین CRISPR/Cas9



شکل شمارهٔ ۳. ویرایش ژن MALAT1 در ژنوم ردهٔ سلولی سرطان سینه MDA-MB-361 توسط فن کریسپر.
شمارهٔ ۱. کنترل منفی PCR (بدون DNA)؛ شمارهٔ ۲. نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ شمارهٔ ۳. سلول‌های گروه کنترل (بدون حذف ژن) که باند کامل ۱۱۶۲ جفت بازی را نشان می‌دهند؛ شمارهٔ ۴. سلول‌های ویرایش‌شدهٔ هموزیگوت (MALAT1- / MALAT1-) که تنها یک باند کوچک ۴۷۱ جفت بازی را دارند؛ شمارهٔ ۵. سلول‌های ویرایش‌شدهٔ هتروزیگوت (MALAT1- / MALAT1+) که دارای هر دو باند ۱۱۶۲ و ۴۷۱ جفت بازی هستند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

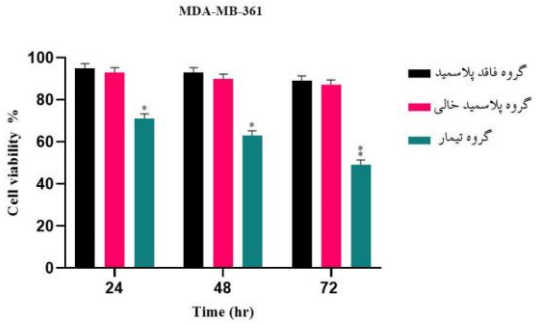


شکل شمارهٔ ٤. نتایج بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-361. حذف ژن MALAT1 به روش کریسپر در سلول‌های گروه تیمار سبب کاهش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی (survivin و BCL2) و افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوزی (BAX، P53، FAS و BAK) گردید.

به‌درستی انجام شد. نظر به اینکه در سلول‌های یوکاریوت، برای هر ژن دو آلل وجود دارد؛ بنابراین، پس از انجام حذف در ژن MALAT1 حالت‌های هتروزیگوت (MALAT1+/ -MALAT1) یا هموزیگوت (MALAT1- / MALAT1-) مشاهده می‌شود (شکل شمارهٔ ۳).

نتیجه تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در سلول‌های ویرایش‌ژنوم‌شده: پس از حذف ژن MALAT1 در سلول‌های MDA-MB-361، سطح بیان ژن‌های پروآپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی به روش real time PCR سنجیده شد. همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۴ ملاحظه می‌شود، بیان ژن‌های پروآپوپتوزی BAX، P53، FAS و BAK در سلول‌های گروه تیمار (حذف‌ژن‌شده)، نسبت به گروه‌های کنترل (گروه پلاسمید خالی و گروه بدون پلاسمید) افزایش داشته است، به‌طوری‌که ژن‌های پروآپوپتوزی P53 (P=0.0113)، BAX (P=0.0243)، BAK (P=0.0183) و FAS (P=0.0086) به‌صورت معنی‌دار افزایش بیان را نشان داده‌اند. علاوه بر این، ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی BCL2 (P=0.0386) و survivin (P=0.0437) کاهش معنا داری در میزان بیان ژن، در مقایسه میان سلول‌های گروه تیمار (حذف‌ژن‌شده) و گروه کنترل داشتند.

نتیجهٔ تکثیر سلولی: میزان تکثیر سلولی در سلول‌های ردهٔ سرطان سینه MDA-MB-361 تیمارشده (MALAT1- /MALAT1-) نسبت به سلول‌های کنترل (MALAT1+/ MALAT1 +) در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج آزمون MTT نشان داد که کاهش تکثیر در سلول‌های سرطانی حاضر در گروه دریافت‌کنندهٔ وکتورهای کریسپری در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشاهده گردید و سطح معنی‌داری به‌ترتیب شامل P=0.0288، P=0.0133 و P=0.0078 بود (شکل شمارهٔ ۵).

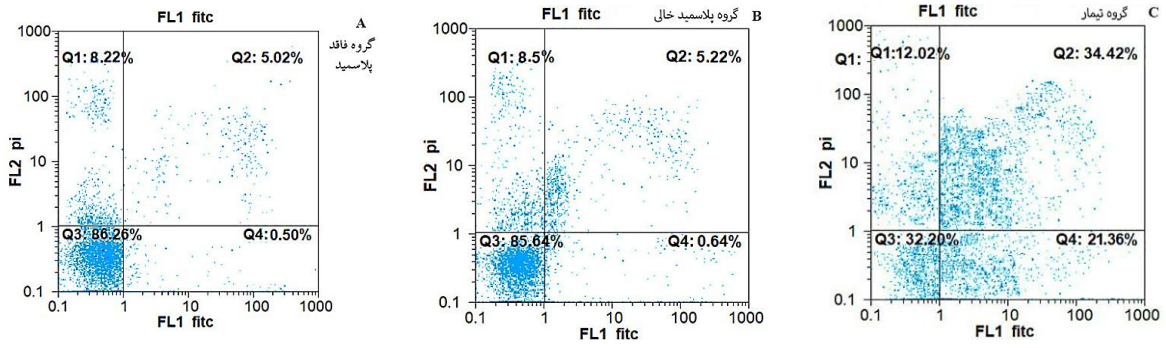


شکل شمارهٔ ۵. ارزیابی میزان زنده‌مانی و تکثیر رده‌های سلولی حذف ژن شده در مقایسه با رده‌های سلولی کنترل. به‌مرور زمان و گذشت ۷۲ ساعت، درصد میزان زیستایی سلول‌های MDA-MB-361 تحت تیمار نسبت به گروه کنترل، به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت. میزان P پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب 0.0288، 0.0133 و 0.0078 بود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

بیشترین میزان کاهش تکثیر سلولی در خصوص سلول‌های تحت تیمار در فاصلهٔ زمانی ۷۲ ساعت دیده شد.

نتایج فلوسیتومتری: ارزیابی میزان آپوپتوز و نکروز در ردهٔ سلول‌های MDA-MB-361 تحت تیمار و سلول‌های گروه پلاسمید خالی و گروه بدون پلاسمید توسط رنگ‌آمیزی Annexcin V-FITC صورت گرفت. مجموع میزان آپوپتوز اولیه و ثانویه در سه گروه تیمار، پلاسمید خالی و بدون پلاسمید به‌ترتیب برابر ۵۵/۷۸، ۵/۸۶ و ۵/۵۲ بود. همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۶ ملاحظه می‌شود، میزان سلول‌های زنده در سلول‌های گروه کنترل بیش از ۸۵ درصد است اما در سلول‌هایی که در اثر عملکرد سامانهٔ کریسپری، ژن MALAT1 آن‌ها تخریب‌شده است، میزان سلول‌های زنده برابر ۳۲/۲۰ درصد است؛ بنابراین، حذف ژن سرطان‌زای MALAT1 از ژنوم سلول‌های سرطانی، سبب کاهش زیستایی و سوق دادن این‌گونه سلول‌ها به سوی مرگ برنامه‌ریزی‌شده می‌گردد.



شکل شمارهٔ ٦. نتایج آنالیز آپوپتوز سلولی به روش سنجش فلوسیتومتری. میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمارشده نسبت به گروه‌های کنترل افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد.

Q1. درصد سلول‌های نکروزشده؛ Q2. درصد سلول‌های آپوپتوز ثانویه؛ Q3. درصد سلول‌های زنده؛ Q4. درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه

بحث و نتیجه‌گیری

سامانهٔ کریسپر ابزار قدرتمندی برای ویرایش ژن با کاربردهای گسترده است. این سامانهٔ می‌تواند منجر به حذف ژن یا اضافه کردن ژن به‌صورت بسیار دقیق شود. هدف قرار دادن دو ناحیه از یک ژن توسط دو نوع RNA راهنما (دو تا sgRNA)، به حذف قطعه ژنی میان دو توالی sgRNA منجر می‌گردد (۲۴). توسعهٔ فناوری‌های کریسپر، تبدیل به روشی نوین و کارآمد برای ایجاد تغییر در ژنوم بسیاری از موجودات شده است. این سامانهٔ می‌تواند در مهندسی ژنوم، موجب فعال‌سازی یا سرکوب بیان ژن‌ها گردد (۲۳). در مطالعه‌ای، ژی و همکاران نشان دادند که MALAT1 در سلول‌های سرطانی رودهٔ بزرگ، افزایش بیان دارد و مهار آن از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند؛ بنابراین، MALAT1 می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی مهم پیش‌آگهی برای سرطان رودهٔ بزرگ در نظر گرفته شود (۲۵). شی و همکاران دریافتند که MALAT1 می‌تواند یک lncRNA آنکوژن باشد که باعث تکثیر کوریوکارسینوما شود و ممکن است به‌عنوان یک هدف درمانی در کوریوکارسینوما انسانی عمل کند (۲۶). ژانگ و همکاران گزارش دادند که MALAT1 در بیماران کارسینوم ریه، سلول غیرکوچک (NSCLC) با افزایش بیان همراه است و همچنین با افزایش مرحلهٔ TNM و متاستاز غدد لنفاوی ارتباط مثبت دارد. ناک‌دان MALAT1 از تکثیر و مهاجرت سلولی و تشکیل کلونی جلوگیری می‌کند، درحالی‌که سبب القای آپوپتوز و توقف چرخهٔ سلولی می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که MALAT1 می‌تواند یک عامل پیش‌بینی‌کننده و هدف درمان بالینی برای سرطان ریه باشد (۲۷). زیدان و همکاران اثبات کردند که بیان MALAT1 در بیماران سرطان سینه در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور چشمگیری

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

افزایش یافته است و میزان بیان MALAT1 با اندازهٔ غدد لنفاوی، بیان گیرندهٔ استروژن، مرحلهٔ تومور و درجهٔ بافت‌شناسی ارتباط مثبت دارد. این داده‌ها نشان می‌دهد که بیان MALAT1 می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر دقیق در تشخیص سرطان سینه استفاده شود و ارزش پیش‌آگهی‌دهنده برای این بیماری دارد (۲۸). یائو و همکاران نشان دادند که بیان MALAT1 در کارسینوم سلول سنگ‌فرشی مری (ESCC)، بالاتر از بافت‌های طبیعی مجاور است و بیان بالای آن با پیش‌آگهی ضعیف همراه است. ناک‌دان MALAT1 باعث کاهش تکثیر سلولی، افزایش آپوپتوز، مهار مهاجرت و تهاجم، کاهش تشکیل کلونی و توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ G2/M می‌شود (۲۹). دنگ و همکاران تشخیص دادند که بیان MALAT1 در سلول‌های سرطان معده، در مقایسه با بافت طبیعی مجاور، بالاتر است. کاهش سطح بیان MALAT1 می‌تواند متاستاز تومور را مهار کند، درحالی‌که افزایش بیان آن متاستاز را تقویت می‌نماید (۳۰). لی و همکاران نقش MALAT1 را در رده‌های سلولی سرطان تخمدان و نمونه‌های تومور بالینی بررسی کردند و دریافتند که MALAT1 به‌طور خاص در رده‌های سلولی سرطان تخمدان بیان دارند و با برهم‌کنش با miRNAها، باعث پیشرفت سرطان تخمدان می‌شوند. ناک‌دان MALAT1 تکثیر و سنتز DNA سلول‌های سرطان تخمدان را سرکوب می‌کند؛ بنابراین، MALAT1 یک lncRNA آنکوژنیک است که باعث تکثیر سرطان تخمدان می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی برای سرطان تخمدان در نظر گرفته شود (۳۱). شی و همکاران ارتباط میان MALAT1 و سرطان مثانه را از جنبهٔ بیماری‌زایی بررسی کردند. این بررسی نشان داد که بیان بالای این ژن، باعث پیشرفت و متاستاز سرطان مثانه می‌شود؛ بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک عامل پیش‌آگهی برای این بیماران در نظر گرفته شود؛ همچنین مطالعات دیگر نشان داده است که MALAT1 سبب مهار آپوپتوز سلول‌های توموری و باعث تهاجم سلول در سرطان مثانه می‌گردد (۳۲). لی و همکاران از طریق آنالیز ریزآرایه، تغییرات بیانMALAT1 را در بافت‌های طبیعی و سرطانی معده نشان دادند. بیان MALAT1 در بافت‌های سرطانی معده بیشتر از بافت‌های مجاور طبیعی بود و بیماران با سطح بیان بالاتر MALAT1، تهاجم عمیق‌تر، تمایل به مرحلهٔ پیشرفته‌تر TNM و زمان بقای کمتری را نسبت به افرادی با سطح بیان پایین MALAT1 از خود نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان MALAT1 با تهاجم موضعی، متاستاز گره لنفی (TNM) ارتباط معنی‌داری دارد و ناک‌دان MALAT1 به‌واسطهٔ siRNA باعث کاهش بیان و تهاجم سلولی می‌شود (۳۳). هو و همکاران نشان دادند که MALAT1 در مولتیپل میلوما (MM)در مقایسه با سلول‌های طبیعی پلاسما به‌شدت بیان‌شده است و افزایش بیان MALAT1 به‌طور معنی‌داری با پیش‌آگهی ضعیف در بیماران MM در ارتباط است. ناک‌دان بیان آن در سلول‌های MM با استفاده از دو الیگو آنتی‌سنس (anti-MALAT1-1/2) انجام گردید که باعث شکافتگی MALAT1 توسط آنزیم ریبونوکلئاز H و به‌طور فراوانی باعث ناک‌دان MALAT1 در سلول‌ها شد (۳۴). چانگ و همکاران تشخیص دادند که افزایش بیان MALAT1، بیان miR-1 را در سلول‌های سرطان پروستات سرکوب و کاهش آن بیان miR-1 را تسهیل می‌کند. کاهش غلظت miR-1 تا حدودی آثار ضدتکثیری، ضدتهاجمی و پروآپوپتوزی را به‌واسطهٔ خاموش‌سازی MALAT1 در سلول‌های سرطان پروستات خنثی می‌کند و از سویی، ناک‌دان MALAT1 مانع تکثیر، مهاجرت و افزایش آپوپتوز از طریق افزایش بیان miR-1 می‌شود؛ همچنین در این مطالعه، KRAS هدف miR-1 بود و miR-1 بیان KRAS را با تعامل مستقیم با آن مهار می‌کند. بیان MALAT1 بیان KRAS را تسهیل می‌سازد، درحالی‌که این اثر توسط تنظیم miR-1 در سلول‌های سرطان پروستات حذف می‌شود. بیان بیش‌ازحد miR-1 مانع تکثیر و مهاجرت و ارتقای آپوپتوز می‌گردد، درحالی‌که آثار ضدتکثیری و ضدتهاجمی و پروآپوپتوزی miR-1

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

توسط افزایش KRAS در سلول‌های سرطان پروستات کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد miR-1 پیشرفت سرطان پروستات را توسط تنظیم KRAS سرکوب می‌کند؛ به‌عبارت‌دیگر، این مطالعه یک مسیر تنظیم‌کنندهٔ جدید MALAT1 / miR-1 / KRAS را در توسعهٔ سرطان پروستات نشان می‌دهد و تأیید می‌کند که MALAT1 تکثیر و مهاجرت سلولی و مهار آپوپتوز توسط کاهش miR-1 و افزایشKRAS را در سلول‌های سرطان پروستات بدون گیرندهٔ آندروژن ترویج می‌دهد (۳۵). زارع و همکاران در یک مطالعه نشان دادند که بیان ژن CCAT1 در رده‌های سلولی آدنوکارسینوم رودهٔ بزرگ در مقایسه با بافت طبیعی مجاور، بالاتر است. به‌منظور جلوگیری از رونویسی یا تغییر ساختار این lncRNA، از فن CRISPR/Cas9 برای حذف ژن CCAT1 استفاده شد. نتایج نشان داد، ناک اوت این ژن با کاهش تعداد و اندازهٔ کلنی‌ها ارتباط معناداری دارد، به‌طوری‌که با کاهش بیان lncRNA CCAT1 رشد، تکثیر و تقسیم سلول‌ها به میزان بسیاری کاهش می‌یابد و می‌تواند متاستاز تومور را مهار کند (۳۶). هبتالا سعید و همکاران ارتباط lncRNA- RP11-156p1.3را با کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) بررسی کردند. آنان نشان دادند که افزایش بیان این lncRNA به‌طور فراوانی باعث افزایش رشد سلول و متاستاز می‌شود. ناک اوت این ژن توسط فن CRISPR/Cas9 به‌طور چشمگیری سطح ncRNA، همچنین به‌طور همزمان سطح مولکول‌های RFTN1 mRNA و سرعت رشد سلول را نیز کاهش می‌دهد. با توجه به اینکه در طول سرطان‌زایی هپاتوسلولار NF-κB نقش مهمی را در توسعهٔ HCC ایفا می‌کند و TNFα یک نقش محوری در تکثیر سلولی این بیماری دارد، نتایج نشان می‌دهد که حذف ژن RP11-156p1.3 منجر به مهار بیان NF-κB و TNFα می‌گردد؛ بنابراین ممکن است این lncRNA به‌عنوان نشانگر زیستی تشخیصی و اهداف بالقوه‌ای برای راهبردهای درمانی HCC در نظر گرفته شود (۳۷). ژیا و همکاران ثابت کردند PANDAR در کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی مجاور، بیان بسیار بالایی دارد. بیان بالای PANDAR در بافت‌های سرطانی باعث افزایش رشد، تکثیر و مهاجرت می‌شود. نشان داده‌شده است که ناک اوت این lncRNA توسط فن CRISPR/Cas9 به کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوپتوز منجر می‌گردد. از سوی دیگر، PANDAR از طریق اتصال به SRSF7، PIM1 را تنظیم می‌کند. توانایی تکثیر سرکوب‌شده و همچنین القای آپوپتوز توسط ناک دان PANDAR، با بیان بالای PIM1 خنثی می‌گردد؛ پس lncRNA PANDAR و PIM1 می‌توانند اهداف درمانی بالقوه‌ای برای کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهانی باشند (۳۸). ژن و همکاران گزارش دادند که ژن UCA1 در سرطان مثانه بیان بالایی دارد و به‌عنوان یک onco-lncRNA باعث پیشرفت سرطان مثانه می‌شود. در این مطالعه، با استفاده از فن CRISPR/Cas9 ژن UCA1 حذف گردید که منجر به مهار بسیار تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم می‌شود. سازوکارهای مرتبط با اثر مهاری CRISPR/ Cas9- UCA1 بر فنوتیپ‌های بدخیم سرطان مثانه به القای توقف چرخهٔ سلولی در مرحلهٔ G1، افزایش فراوان آپوپتوز و افزایش فعالیت MMPs نسبت داده می‌شود؛ بنابراین، UCA1 ممکن است به‌عنوان یک نشانگر غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان مثانه استفاده گردد (۳۹). ژانگ و همکاران بیان ژن PDEF را در کارسینوم معده ارزیابی کردند. در این مطالعه، برای ایجاد سلول‌های حذفی PDEF، از روش CRISPR/Cas9 استفاده شد و عملکرد ژن PDEF در تکثیر سلولی و تهاجم سرطان معده بررسی گردید. نتایج نشان داد که حذف ژن PDEF در سلول‌های سرطانی باعث مهار تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم می‌شود و ممکن است به‌عنوان یک هدف درمانی جدید در سرطان معده به‌کار رود (۴۰). با توجه به اینکه تاکنون از فن کریسپر برای تخریب ژن MALAT1 در ردهٔ سلولی MDA-MB-361مربوط به سرطان سینه استفاده نشده و آثار حاصل از این دست‌ورزی در بیان

ژن‌های مرتبط با آپوپتوز بررسی نشده است، در مطالعهٔ حاضر، ژن MALAT1 با فن CRISPR/Cas9 ناک‌اوت گردید و تغییرات حذفی بر سطح بیان ژن‌های آپوپتوزی توسط روش real time PCR ارزیابی شد. علاوه بر آن، تکثیر و مهاجرت سلولی نیز در ردهٔ سلولی سرطان سینه پس از ترنسفکشن توسط وکتورهای pX459-sgRNA1 و pX459-sgRNA2 بررسی گردید که نتایج نشان‌دهندهٔ کاهش تکثیر و رشد سلول‌های سرطانی بود؛ بنابراین به نظر می‌رسد، حذف انکوژن MALAT1 به روش نوین کریسپر در کنترل تکثیر سلول‌های سرطانی نقش مؤثری ایفا کرده است.

RNA غیرکدکنندهٔ MALAT1 در بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطان سینه افزایش بیان دارد و به‌عنوان یک عامل سرطان‌زا در این سرطان عمل می‌کند. حذف ژن MALAT1 می‌تواند تأثیرات بسزایی بر رفتار سلول‌های سرطانی داشته باشد که داده‌های حاصل از این مطالعه، تأثیر مثبت تخریب ژن را در جلوگیری از پیشرفت سرطان سینه تأیید می‌کند. فناوری CRISPR/Cas9 یک روش کارآمد برای ایجاد این تأثیرات در کنترل سرطان بود. با توجه به بیان بالای MALAT1 در انواع سرطان‌ها، کنترل بیان این ژن می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی برای انواع سرطان‌ها در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر منتج از پایان‌نامهٔ دکترای تخصصی با مصوبهٔ کد اخلاق به شمارهٔ IR.IAU.M.REC.1399.010 است. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانهٔ اعضای محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه کمال تقدیر و تشکر داریم.

کد اخلاق: IR.IAU.M.REC.1399.010

References

1. Zahedi R, Molavivardanjani H, Baneshi MR, Haghdoost AA, Malekpourafshar R. Incidence trend of breast cancer in women of Eastern Mediterranean region countries from 1998 to 2019 a systematic review and meta-analysis. BMC Womens Health 2020; 20:53-62. doi: 10.1186/s12905-020-00903-z
2. Alziftawi NH, Shafie AA, Mohamedibrahim MI. Cost effectiveness analyses of breast cancer medications use in developing countries a systematic review. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res 2020; 27:1-11. doi: 10.1080/ 14737167.2020.1794826.
3. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries a review article. Iran J Public Health 2018; 47:309-16.
4. Ghafourifard S, Tamizkar KH, Hussen BM, Taheri M. An update on the role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of breast cancer. Pathol Res Pract 2021; 219. doi: 10.1016/j.prp.2021.153373.
5. Li He, Si qing Ma, Jin Huang, Xiao ping Chen, Hong hao Zhou. Roles of long noncoding RNAs in colorectal cancer metastasis. Oncotarget 2017; 8: 39859-76. doi: 10.18632/oncotarget.16339.
6. Zhou S, He Y, Yang S, Hu J, Zhang Q, et al. The regulatory roles of lncRNAs in the process of breast cancer invasion and metastasis. Biosci Rep 2018; 38. doi: 10.1042/BSR20180772.
7. Dey BK, Mueller AC, Dutta A. Long non coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease. Transcription 2014; 5:e944014. doi: 10.4161/21541272.2014.944014.
8. Zhao M, Wang S, Li Q, Ji Q, Guo P, et al. MALAT1 a long non-coding RNA highly associated with human cancers. Oncol Lett 2018; 16:19-26. doi: 10.3892/ol.2018.8613.
9. Li X, Chen N, Zhou L, Wang C, Wen X, et al. Genome wide target interactome profiling reveals a novel EEF1A1 epigenetic pathway for oncogenic lncRNA MALAT1 in breast cancer. Am J Cancer Res 2019; 9:714-29.
10. Wang Y, Xue D, Li Y, Pan X, Zhang X, et al. The long noncoding RNA MALAT-1 is a novel biomarker in various cancers a meta analysis based on the GEO database and literature. J Cancer 2016; 7:991-1001. doi: 10.7150/jca.14663. eCollection 2016.
11. Dake C, Xu T, Chang HH, Song Q, Zhu Y, et al. The role of MALAT1 in cancer. J Cancer Sci Clin Ther 2019; 3: 5-27. doi: 10.26502/jcsct.5079016.
12. Peng R, Luo C, Guo Q, Cao J, Yang Q, et al. Association analyses of genetic variants in long non-coding RNA MALAT1 with breast cancer susceptibility and mRNA expression of MALAT1 in Chinese Han population. Gene 2018; 642: 241-8. doi: 10.1016/j.gene.2017.11.013.
13. Shen F, Zheng H, Zhou L, Li W, Xu X. Overexpression of MALAT1 contributes to cervical cancer progression by acting as a sponge of miR-429. J Cell Physiol 2019; 234:11219-26. doi: 10.1002/jcp.27772.
14. Chen Y, Huang W, Sun W, Zheng B, Wang C, et al. LncRNA MALAT1 promotes cancer metastasis in osteosarcoma via activation of the PI3K-Akt signaling pathway. Cell Physiol Biochem 2018;

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]

51:1313-26. doi: 10.1159/000495550.
15. Sun Z, Ou C, Liu J, Chen C, Zhou Q, et al. YAP1-induced MALAT1 promotes epithelial–mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer. Oncogene 2019; 38:2627-44. doi: 10.1038/s41388-018-0628-y.
16. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. Nature 2012; 486:353-60. doi: 10.1038/nature11143.
17. Yoshimoto R, Mayeda A, Yoshida M, Nakagawa S. MALAT1 long non-coding RNA in cancer. Biochim Biophys Acta 2016; 1859:192-9. doi: 10.1016/j.bbagrm.2015.09.012.
18. Gayatri A, Diermeier S, Akerman M, Chang KC, Wilkinson LE, et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. Gens Dev 2016; 30:34-51. doi: 10.1101/gad.270959.115.
19. Mendell JT. Targeting a long noncoding RNA in breast cancer. N Engl J Med. 2016; 374:23:2287-9. doi: 10.1056/NEJMcibr1603785.
20. Louie E, Chen XF, Coomes A, Ji K, Tsirka S, et al. Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. Oncogene 2013; 32: 4064-77. doi: 10.1038/onc.2012.417.
21. Vijai S, Gohil N, Garcia RR, Braddick D, Fofié CK. Recent advances in CRISPR-Cas9 genome editing technology for biological and biomedical investigations. J Cell Biochem 2018; 119:81-94. doi: 10.1002/jcb.26165.
22. Carlos PQ, Aparicio-Prat E, Arnan C, Polidori T, Hermoso T, et al. Scalable design of paired CRISPR guide RNAs for genomic deletion. PLoS Comput Biol 2017; 13 doi: 10.1371/journal.pcbi.1005341.
23. Tianzuo Z, Rindtorff N, Betge J, Ebert MP, Boutros M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. Semin cancer biol. Academic Press 2019; 55: 106-119. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.04.001.
24. Yuan R, Varanasi M, Mendes S, Yamagata HM, Wilson RD, et al. Poly (Beta-Amino Ester) Nanoparticles Enable Nonviral Delivery of CRISPR-Cas9 Plasmids for Gene Knockout and Gene Deletion. Mol Ther Nucleic Acids 2020; 20: 661-72. doi: 10.1021/acs.biomac.2c00137.
25. Qiong W, Meng WY, Jie Y, Zhao H. LncRNA MALAT1 induces colon cancer development by regulating miR-129-5p/HMGB1 axis. J Cell Physiol 2018; 233 6750-57. doi: 10.1002/jcp.26383.
26. Shi D, Zhang Y, Lu R, Zhang Y. The long non-coding RNA MALAT1 interacted with miR-218 modulates choriocarcinoma growth by targeting Fbxw8. Biomed Pharmacother 2018; 97: 543-50. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2017.10.083.
27. Zhang R, Xia Y, Wang Z, Zheng J, Chen Y, et al. Serum long non coding RNA MALAT-1 protected by exosomes is up-regulated and promotes cell proliferation and migration in non-small cell lung cancer. Biochem Biophys Res Commun 2017; 490: 406–14. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.055.
28. Zidan HE, Karam RA, El-Seifi OS, Elrahman TA . Circulating long non-coding RNA MALAT1 expression as molecular biomarker in Egyptian patients with breast cancer. Cancer genet 2018; 20: 32-7. doi: 10.1016/j.cancergen.2017.11.005.
29. Wenjian Y, Bai Y, Li Y, Guo L, Zeng P, et al. Upregulation of MALAT-1 and its association with survival rate and the effect on cell cycle and migration in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Tumor Biol 2016; 37: 4305-12. doi: 10.1007/s13277-015-4223-3.
30. Quan-jun D, Xie LQ, Li H. Overexpressed MALAT1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells via increasing EGFL7 expression. Life Sci 2016; 157: 38-44. doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.041.
31. Ruilin L, Xue M, Zhang L, Lin ZQ. Long noncoding RNA MALAT1-regulated microRNA 506 modulates ovarian cancer growth by targeting iASPP. Onco Target Ther 2017; 10: 35-42. doi:10.2147/OTT.S112686.
32. Xie H, Liao X, Chen Z, Fang Y, He A, et al. LncRNA MALAT1 inhibits apoptosis and promotes invasion by antagonizing miR-125b in bladder cancer cells. J Cancer 2018; 8: 3803-11. doi: 10.7150/jca.21228.
33. Jijun L, Gao J, Tian W, Li Y, Zhang J. Long non-coding RNA MALAT1 drives gastric cancer progression by regulating HMGB2 modulating the miR-1297. Cancer Cell Int 2017; 17: 44-9. doi: 10.1186/s12935-017-0408-8.
34. Yi H, Lin J, Fang H, Fang J, Li C, et al. Targeting the MALAT1/PARP1/LIG3 complex induces DNA damage and apoptosis in multiple myeloma. Leukemia 2018; 32: 2250-62. doi: 10.1038/s41375-018-0104-2.
35. Chang J, Xu W, Du X, Hou J. MALAT1 silencing suppresses prostate cancer progression by upregulating miR-1 and downregulating KRAS. Onco Targets Ther 2018; 11: 3461–73. doi: 10.2147/OTT.S164131.
36. Khadijeh Z, Shademan M, Ghahramani Seno MM, Dehghani H. CRISPR/Cas9 knockout strategies to ablate CCAT1 lncRNA gene in cancer cells. Biol Proced Online 2018; 1: 1-12. doi: 10.1186/s12575-018-0086-5.
37. Said AH, Boshra MS, El Meteini MS, Shafei AE, Matboli M. lncRNA-RP11-156p1. 3, novel diagnostic and therapeutic targeting via CRISPR/Cas9 editing in hepatocellular carcinoma. Genomics 2020; 112: 3306-14. doi: 10.1016/j. ygeno.2020.06.020.
38. Tingting J, Wang F, Qiao B, Ren Y, Xing L, et al. Knockdown of lncRNA pandar by crispr-dCas9 decreases proliferation and increases apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Front Mol Biosci 2021; 8: 68-75. doi: 10.3389/fmolb.2021.653787.
39. Shuai Z, Hua L, Liu YH, Sun XM, Jiang MM, et al. Inhibition of long non-coding RNA UCA1 by CRISPR/Cas9 attenuated malignant phenotypes of bladder cancer. Oncotarget 2017; 8: 9634-46. doi: 10.18632/oncotarget.14176.
40. Yi-Qiang Z, Pei JH, Shi SS, Guo XS, Cui GY, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of the PDEF gene inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells. Biomed Pharmacother 2019; 111: 76-85. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.048.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.2.3.4]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.2.18]