

## Evaluation of the Effect of MAGE-A3 Tumor Antigen on the Oncolytic Activity of Reovirus in Colorectal Cancer Cell Lines

Mehri Gholi, Somayeh Shatizadeh Malekshahi\*, Taravat Bamdad

Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Iran.

Received: October 12, 2022; Accepted: April 04, 2023

### Abstract

**Background and Aim:** Colorectal cancer (CRC) is the third most deadly and fourth most commonly diagnosed cancer in the world. Although many interventions such as surgery, radiation therapy and chemotherapy are used nowadays, research on other methods is being carried out too. The use of tumor antigens against the tumor is a kind of treatment that in combination with the virus can better stimulate the immune system against the tumor. The use of oncolytic viruses with natural characteristics in destroying cancer cells has provided a wide field for further studies. The aim of this study was to investigate the effect of MAGE-A3 tumor antigen on the oncolytic activity of Reovirus in colorectal cancer cell lines.

**Methods:** In this experimental study L929, a type of mouse fibroblast cell line, was used as a host cell for Reovirus propagation. Reovirus titer was determined by CCID50 method and the appropriate titer was selected for the study. The MAGEA3- expressing plasmid was transfected into colorectal cancer cells of the mouse (CT26) and human (Caco<sub>2</sub>) origin and infected with Reovirus (MOI = 1 and MOI = 0.01). 24 hours after Reovirus inoculation and observing CPE, the cells were collected to investigate apoptosis and measured by flow cytometry.

**Results:** The apoptosis rate in CT26 cells in the presence of MAGE-A3 expressing vector and inoculated with Reovirus was higher (MOI=1, 38.5 ± 3.8% / p-value < 0.02 and in MOI=0.01, 30 ± 2.1% / p-value < 0.005) in comparison to the absence of MAGE-A3 expressing vector (MOI=1, 22.4 ± 0.9 and MOI=0.01, 15.8 ± 0.3). On the other hand, the rate of apoptosis in Caco<sub>2</sub> cells in the presence of MAGE-A3 expressing vector and inoculated with Reovirus (MOI=1, 22.5 ± 1.8% / p-value=ns and in MOI=0.01, 11 ± 2% / p-value=ns) was lower than in the absence of vector expressing MAGE-A3 (MOI=1, 45.5 ± 2.7 and MOI=0.01, 11.5 ± 0.9). It can be stated that according to the results of this study, the cytolysis effect of Reovirus in Caco<sub>2</sub> cell line is higher than that of CT26 cell and also the rate of cell cytolysis in the presence of MAGE expressing vector is almost twice more than that of this vector in Caco<sub>2</sub> cells.

**Conclusion:** Given the higher cytolysis of the virus in Caco<sub>2</sub> cells and the status of P53 and Ras genes in these two cells, in which P53 is mutant but Ras is active, the virus has more activity and MAGE-A3 presence reduces virus activity by reducing Ras activity.

**Keywords:** Colorectal cancer; Reovirus; tumor antigen

**Please cite this article as:** Gholi M, Shatizadeh Malekshahi S, Bamdad T. Evaluation of the Effect of MAGE-A3 Tumor Antigen on the Oncolytic Activity of Reovirus in Colorectal Cancer Cell Lines. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(2):75-88.

\***Corresponding Author:** Somayeh Shatizadeh Malekshahi; **Email:** s.shatizadeh@modares.ac.ir  
Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Iran.

## بررسی تأثیر آنتی ژن توموری MAGE-A3 بر فعالیت اونکولایتنیکی ویروس رئو در رده‌های سلول توموری کولورکتال

مه‌ری قلی، سمیه شاطی‌زاده ملک‌شاهی\*، طراوت بامداد

گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

### چکیده

**سابقه و هدف:** سرطان کولورکتال سومین دلیل بدخیمی شایع و چهارمین دلیل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. اگرچه بسیاری از درمان‌ها از جمله جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی برای آن استفاده می‌شود، ولی با توجه به مؤثر نبودن آنها تحقیق‌ها روی سایر روش‌ها در حال انجام است. استفاده از آنتی‌ژن‌های توموری علیه تومور یکی از انواع روش‌های درمانی است که در همراهی با سایر روش‌های درمانی می‌تواند سبب تحریک بهتر سیستم ایمنی علیه تومور شود. استفاده از ویروس‌های اونکولایتنیک با ویژگی طبیعی در از بین بردن سلول‌های سرطانی زمینه گسترده‌ای را برای مطالعه‌های بیشتر فراهم کرده است. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر آنتی‌ژن توموری MAGE-A3 بر فعالیت اونکولایتنیکی ویروس رئو در رده‌های سلول توموری کولورکتال است.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی از سلول L929 که جزو رده سلولی فیروبلاست است به عنوان سلول میزبان برای تکثیر رئوویروس استفاده شد. تیتراژ ویروس با روش CCID50 تعیین و تیتراژ مناسب برای مطالعه انتخاب شد. پلاسمید بیان‌کننده MAGEA3 به سلول‌های سرطان کولورکتال با منشأ موشی (CT26) و انسانی (Caco<sub>2</sub>) ترانسفکت شده و با ویروس رئو (MOI = ۱ و MOI = ۰/۰۱) آلوده شدند. ۲۴ ساعت بعد از تلقیح رئوویروس و مشاهده CPE سلول‌ها برای بررسی آپوپتوز جمع شدند و با روش فلوسایتومتری سنجیده شدند.

**یافته‌ها:** میزان آپوپتوز در سلول CT26 در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 و آلوده شده با ویروس رئو (در MOI = ۱  $3/8 \pm 3/8$  درصد و در MOI = ۰/۰۱  $2/1 \pm 3/0$  درصد و  $p\text{-value} < 0/05$ ) نسبت به نبود وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 (در MOI = ۱  $2/4 \pm 0/9$  درصد و در MOI = ۰/۰۱  $0/3 \pm 15/8$  درصد) بیشتر بود. از طرفی میزان آپوپتوز در سلول Caco<sub>2</sub> در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE و آلوده شده با ویروس رئو (در MOI = ۱  $1/8 \pm 22/5$  درصد و  $p\text{-value} = \text{NS}$  / در MOI = ۰/۰۱  $2 \pm 11$  درصد و  $p\text{-value} = \text{NS}$ ) نسبت به نبود وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 (در MOI = ۱  $2/7 \pm 45/5$  درصد و MOI = ۰/۰۱  $0/9 \pm 11/5$  درصد) کمتر بود. می‌توان چنین بیان کرد که با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه تأثیر سیتولیز توسط ویروس رئو در رده سلولی Caco<sub>2</sub> بیشتر از سلول CT26 است و همچنین میزان کشندگی سلول در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 در سلول CT26 تقریباً دو برابر حالتی است که این وکتور در سلول Caco<sub>2</sub> وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به میزان کشندگی بالاتر ویروس در سلول‌های Caco<sub>2</sub> و وضعیت ژن‌های P53 و Ras در این سلول به نظر می‌رسد که P53 موتانت ولی Ras فعال است، ویروس فعالیت بیشتری داشته و حضور MAGE-A3 با کاهش فعالیت Ras، از فعالیت ویروس می‌کاهد.

**واژگان کلیدی:** سرطان کولورکتال؛ آنتی‌ژن توموری؛ ویروس رئو

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Gholi M, Shatizadeh Malekshahi S, Bamdad T. Evaluation of the Effect of MAGE-A3 Tumor Antigen on the Oncolytic Activity of Reovirus in Colorectal Cancer Cell Lines. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(2):75-88.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: سمیه شاطی‌زاده ملک‌شاهی؛ آدرس پست الکترونیکی: s.shatizadeh@modares.ac.ir

گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران.

## مقدمه

سرطان بیماری شایعی است که جمعیت زیادی در تمام سنین در سرتاسر جهان به آن مبتلا می‌شوند. در ۹۰ تا ۹۵ درصد موارد، جهش‌های ژنتیکی و فاکتورهای محیطی سبب ایجاد سرطان می‌شوند و در ۵ تا ۱۰ درصد باقیمانده وراثت دخالت دارد (۱). سرطان کولورکتال (CRC) یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در دنیا و سومین دلیل مرگومیر ناشی از سرطان است. این سرطان در مردان رایج‌تر است و غالباً به سبب افزایش سن و سبک زندگی افراد به وجود می‌آید و در افرادی که سابقه خانوادگی دارند، احتمال ابتلا دو تا سه برابر می‌شود. علائم کلی این بیماری شامل یبوست، وجود خون در مدفوع، کاهش اشتها، کاهش وزن، تهوع و استفراغ در افراد بالای ۵۰ سال می‌باشد (۲، ۳). روش‌های درمانی مختلفی از جمله جراحی، شیمی‌درمانی، رادیودرمانی و هورمون‌درمانی برای درمان CRC وجود دارد. این روش‌ها دارای عوارض جانبی فراوانی نیز هستند و سلول‌های سالم را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند و همواره به‌کارگیری روش‌های جدید و درمان‌های هدفمند، مورد توجه محققان بوده است. روش‌هایی که علاوه بر بهینه بودن و از بین بردن سلول‌های سرطانی، کمترین آسیب را در بافت‌های سالم ایجاد کنند. درمان با ویروس‌های اونکولایتیکی (OV) بر اساس تکثیر انتخابی ویروس‌ها در سلول‌های سرطانی و گسترش آن درون تومور بدون آسیب رساندن به بافت طبیعی انجام می‌گیرد. ویروس‌های اونکولایتیکی شامل طیف وسیعی از ویروس‌های با ژنوم DNA و RNA هستند (۴). رتروویروس متعلق به خانواده رتروویریده بوده و یک ویروس RNA دار غیرپاتوژن انسانی است که خاصیت اونکولایتیکی دارد. مطالعه‌های زیادی نیز نشان داده‌اند که رترو ویروس سوش 3 Dearing (T3D) نسبت به دیگر سوش‌ها دارای خاصیت اونکولایتیکی بیشتری است (۵) که در این پروژه نیز از آن استفاده شد. از مزایای رتروویروس به عنوان عامل نویدبخش در سرطان می‌توان به این موارد اشاره کرد که دارای تروپیسم به سلول‌های توموری است که سبب تکثیر انتخابی در این سلول‌ها می‌شود و چرخه زندگی آن در

سیتوپلاسم رخ می‌دهد، بنابراین بعید است قطعات ژنوم رتروویروس به DNA انسان متصل شوند (۶). از محدودیت‌های ویروس درمانی به واسطه OVها ناتوانی در هدف قرار دادن مناطق عمقی تومور و ناتوانی برای زنده ماندن در گردش خون بیمار برای هدف قرار دادن تومور در مکان‌های دورتر است. یکی از راهکارهای پیشنهادی این است که از سلول‌های حامل (سلول‌های بنیادی یا سلول T) برای حمل OV استفاده شود (۷). استفاده از آنتی‌ژن‌های توموری برای تحریک سیستم ایمنی علیه تومور نیز یکی از انواع دیگر این روش‌هاست که در همراهی با ویروس می‌تواند پس از اونکولیز سلول سرطانی توسط ویروس سبب تحریک بهتر سیستم ایمنی علیه تومور شود. آنتی‌ژن‌های بیضه‌ای سرطان یا CTA (Cancer testis antigens) دسته‌ای از آنتی‌ژن‌های توموری هستند که در طیف وسیعی از سرطان‌های انسانی بیان می‌شوند. از جمله مهم‌ترین CTAها خانواده MAGE (Melanoma Antigen Gene) است و نخستین CTA شناسایی شده MAGE-A1 بود که توسط مولکول MHC ارائه شده در سطح سلول‌های T سایتولیتیک در سطح سلول‌های ملانوم تشخیص داده شد (۸). MAGE-A3 یکی از ایمنی‌زاترین CTAهایی است که تاکنون شناخته شده است. بیان مکرر و زیاد MAGE-A3 در طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها، سبب شده است جایگاه ویژه‌ای در بین آنتی‌ژن‌های مرتبط با تومور داشته باشد. ذکر این نکته لازم است که MAGE-A3 با مهار آپوپتوز در سلول‌های توموری در فرآیند تومورزایی دخیل است (۹). با توجه به موارد یادشده در زمینه کارایی روش‌های درمانی بر پایه ویروس‌ها و آنتی‌ژن‌های توموری، به نظر می‌رسد استفاده توأم از دو روش ایمونوتراپی و ویروس درمانی بتواند کارایی درمان را افزایش دهد. از آنجا که عوامل مختلف استفاده شده در درمان سرطان می‌تواند بر یکدیگر تأثیر هم‌افزایی یا کاهش‌ی داشته باشند، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر آنتی‌ژن توموری MAGE-A3 بر فعالیت اونکولایتیکی ویروس رترو در رده‌های سلول توموری کولورکتال است.

## روش کار

تحقیق حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی انجام شد.

تهیه پلاسمید MAGE-A3: پلاسمید -OFPSpark- pCMV3- MAGEA3 با اندازه ۶۷۴۶ جفت باز است که یک وکتور بیانی در سلول‌های پستانداران واجد ژن *mage* و مارکر OFPSpark با اندازه ۱۶۳۲ جفت باز است که دارای فاکتور مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است. به علاوه دارای دو جایگاه برش آنزیم با اثر محدود *KpnI* + *XbaI* است. وکتور مذکور یاد شده به صورت تجاری موجود است و از شرکت Sinobiological چین خریداری شد. مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.MODARES.REC.1397.19 در کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس تأیید شده است.

**تهیه باکتری مستعد (competent) و انتقال پلاسمید MAGE-A3 به درون آن (ترانسفورمیشن):**

برای این کار باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$ ، در محیط مایع LB (Luria Bertani) فاقد کانامایسین به صورت شبانه کشت داده شد (۱۲-۱۶ ساعت). سپس به نسبت ۱:۵۰ در محیط LB مایع رقیق شده و به مدت سه ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۲۲۰ کشت داده شد تا به چگالی نوری تقریبی ۰/۶ برسد. باکتری با روش بیوشیمیایی کلرید کلسیم ۰/۱ مولار برای پذیرش پلاسمید مستعد شد. برای انتقال پلاسمید به سلول‌های مستعد، به میزان یک میکرولیتر از پلاسمید با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر به ۱۰۰ لاند سلول مستعد اضافه شد. سپس به وسیله شوک حرارتی (۹۰ ثانیه در ۴۲ درجه) انتقال پلاسمید به درون باکتری انجام شد. سپس یک میلی‌لیتر محیط LB مایع و فاقد کانامایسین به لوله اضافه شده و به مدت ۳-۱ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه با دور rpm ۲۲۰ قرار داده شد. سپس ۱۰۰-۱۵۰ میکرولیتر از کشت باکتری ترنسفرم شده روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین (۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر) به سطح محیط کشت پخش شده و ظرف پتری به مدت ۱۴-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار داده شد. کلونی‌های باکتری‌هایی که پلاسمید را

پذیرفته‌اند، در سطح محیط کشت پدیدار خواهند شد. از کلونی‌های منفرد روی پلیت به طور مجزا برداشته شد و در پنج میلی‌لیتر LB حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

### استخراج پلاسمید و بررسی در ژل الکتروفورز:

پس از حدود ۱۶ ساعت استخراج پلاسمید با استفاده از کیت GeneAll (® Expresp™ Plasmid SV mini) به روش miniprep از باکتری‌های کشت داده شده طبق دستورالعمل کیت انجام شد. کمیت و کیفیت پلاسمید استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ سنجیده شد. در نهایت بررسی DNA استخراج شده در ژل آگارز انجام شد.

### کشت سلول:

از سلول L929 (بانک سلولی گروه ویروس‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس) که جزو رده سلولی فیبروبلاست و جدا شده از بافت پستان و چربی موش نر C3H/An ۱۰۰ روزه و از نوع چسبنده است به عنوان سلول میزبان برای تکثیر رئوویروس استفاده شد (۱۰). سلول‌های CT26 و Caco<sub>2</sub> که به ترتیب سلول مدل سرطان کولورکتال موشی و انسانی از نوع چسبنده هستند نیز استفاده شد (۱۱).

### کشت سلول L929 و تهیه استوک ویروس رئو:

رده سلولی L929 در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در شرایط استریل و با استفاده از هود لامینار در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شد. سویه رئوویروس نیز از گروه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس فراهم شد. پس از رسیدن سلول‌های L929 به Confluency مناسب ویروس رئو به سلول‌ها تلقیح شد و فلاسک‌ها ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای جریان ۵ درصد CO<sub>2</sub> قرار داده شدند. با ظهور آثار سیتوپاتیک تخریب سلولی (CPE) ناشی از عفونت ویروس رئو سلول‌ها طی سه بار انجماد و ذوب

آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ترانسفکشن سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen آمریکا) طبق روش زیر انجام شد: ابتدا به ازای هر چاهک از پلیت، دو میکرولیتر از لیپوفکتامین به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت افزوده شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. همچنین به ازای هر چاهک چهار میکرولیتر از پلاسمید با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مخلوط شد. سپس رقت‌های پلاسمید و لیپوفکتامین با یکدیگر مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه برای تشکیل کمپلکس پلاسمید-لیپوفکتامین، در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق به هر چاهک اضافه شد و انکوباسیون در ۳۷ ادامه پیدا کرد. بعد از گذشت چهار ساعت محیط رویی سلول‌های موجود را از پلیت خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط به همراه سرم ۵ درصد و بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد و دوباره به انکوباتور انتقال داده شد. شاخص بررسی فرایند ترانسفکشن، استفاده از پلاسمید کدکننده پروتئین فلورسنتس نارنجی (OFP) است که در معرض اشعه فرابنفش، نور نارنجی/قرمز را از خود ساطع می‌کند. سپس مشاهده و بررسی وضعیت بیان ژن در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن توسط میکروسکوپ فلورسنت انجام شد که بر حسب زمان به دست آمده در بهینه‌سازی پس از ۷۲ ساعت MAGE-A3 بهتر بیان شد. بعد از ۷۲ ساعت به دلیل اینکه سلول CT26 سلول حساسی است بلافاصله بعد از خارج کردن محیط بدون انجام شست‌وشو، ویروس رتو با  $MOI = 1$  و  $MOI = 0.1$  اضافه شد. (مجموع محیط و ویروس برای هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ۲۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد) و در انکوباتور قرار داده شد. ۲۰ ساعت بعد از تلقیح ویروس و مشاهده CPE سلول‌ها برای بررسی آپتوز جمع‌آوری و با روش فلوسایتومتری سنجیده شدند. از مجموع هشت چاهک، چهار چاهک با MAGE-A3 ترانسفکت شدند که به دو چاهک از آن ویروس رتو با  $MOI = 1$  و به دو چاهک دیگر ویروس رتو با  $MOI = 0.1$  تلقیح شد. به یکی از دو چاهک دیگر که فقط حاوی سلول CT26 و محیط بودند ویروس رتو با  $MOI = 1$  و به چاهک

تخریب و همراه با محیط واجد ویروس در  $15000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محیط رویی دارای ویروس جمع‌آوری شد و به مقادیر کم تقسیم و بعد از تعیین تیتراژ، تا زمان استفاده در ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

### تعیین تیتراژ ویروس با روش CCID50 و انتخاب تیتراژ مناسب:

اساس این روش اندازه‌گیری رقتی از ویروس است، که ۵۰ درصد از سلول‌های کشت را آلوده کند. برای تعیین عیار عفونی رتوویروس تک لایه‌ای از سلول‌های L929 در پلیت ۹۶ چاهکی تهیه شد. به طوری که در هر چاهک به میزان  $1 \times 10^4$  سلول وارد شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سلول‌ها با PBS (Phosphate Buffer saline) دو بار شست‌وشو داده شدند. از طرفی رقت‌های ۱۰ برابری از رتوویروس با محیط کشت تا  $10^9$  تهیه و سپس به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از هر رقت ویروس اضافه شد و برای هر رقت ۵ تکرار گذاشته شد. یک ردیف از چاهک‌ها بدون تلقیح ویروس به عنوان شاهد سلول و یک ردیف دیگر با تلقیح ویروس رقیق نشده به عنوان شاهد ویروس در نظر گرفته شد. برای جذب ویروس به سلول، پلیت‌ها یک ساعت در انکوباتور ۳۷ حاوی ۵ درصد  $CO_2$  قرار داده شدند. بعد از گذشت زمان لازم، مایع حاوی ویروس از روی سلول‌ها برداشت و ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم به هر چاهک اضافه و پلیت ۷۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. در نهایت از فرمول رید - مانچ برای تعیین تیتراژ ویروس استفاده شد (۱۲).

### ترانسفکشن پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 به سلول‌های CT26 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و تلقیح با ویروس رتو ( $MOI = 1$ و $MOI = 0.1$ ):

برای ورود پلاسمید حاوی ژن MAGE-A3، ابتدا سلول‌های CT26 در چاهک‌های پلیت ۲۴ تایی کشت سلولی، در انکوباتور با دمای ۳۷ و ۵ درصد  $CO_2$ ، برای رسیدن به تراکم ۹۰ درصد در هنگام ترانسفکشن، کشت داده شدند. محیط کشت استفاده شده برای سلول‌ها، DMEM (حاوی ۱۰ درصد FBS) و

غشاء در آپوپتوز، به داخل سلول رفته و سلول زنده را از مرده و مراحل آپوپتوز را شناسایی کند. سلول‌ها با تریپسین از کف پلیت جدا و با محلول PBS شست‌وشو داده شدند و به مدت پنج دقیقه در دور ۱۲۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتیگراد قرار دادند. در مرحله بعد به رسوب حاصل از سانتریفیوژ سلول‌ها ۳۰۰ میکرولیتر بافر بایندینگ اضافه شد. به دنبال اضافه کردن بافر بایندینگ سه میکرو لیتر از رنگ PI و سه میکرو لیتر از رنگ انکسین V نیز به محتویات موجود در میکروتیوب اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. در نهایت خوانش با دستگاه فلوسایتومتری و آنالیز با نرم‌افزار flowjo انجام شد.

### آنالیز آماری و مقایسه نتایج:

تمامی آزمون‌ها به صورت تکرارهای سه‌تایی انجام و داده‌ها به صورت میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد تکرار بر اساس سوابق آزمایش‌هایی که در شرایط مشابه انجام شده است، انتخاب شد. با توجه به شرایط یکسان و یکنواختی مواد آزمایش و کنترل نوسان‌های خطای آزمایش، تعداد سه تکرار انتخاب شد. از آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی تفاوت‌های آماری بین گروه‌ها استفاده شد. تمامی بررسی‌های آماری و همچنین ترسیم تصاویر و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد.  $P < 0.05$  بیانگر معنادار بودن داده است.

## یافته‌ها

یافته حاصل از الکتروفورز پلاسمید MAGE-A3 در ژل

### آگارز یک درصد:

پس از آماده‌سازی باکتری مستعد، باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط LB آگار واجد کانامیسین کشت داده شدند و کلونی‌های حاصل پس از استخراج پلاسمید، از لحاظ دارا بودن وکتور مورد نظر بررسی شدند (شکل ۱).

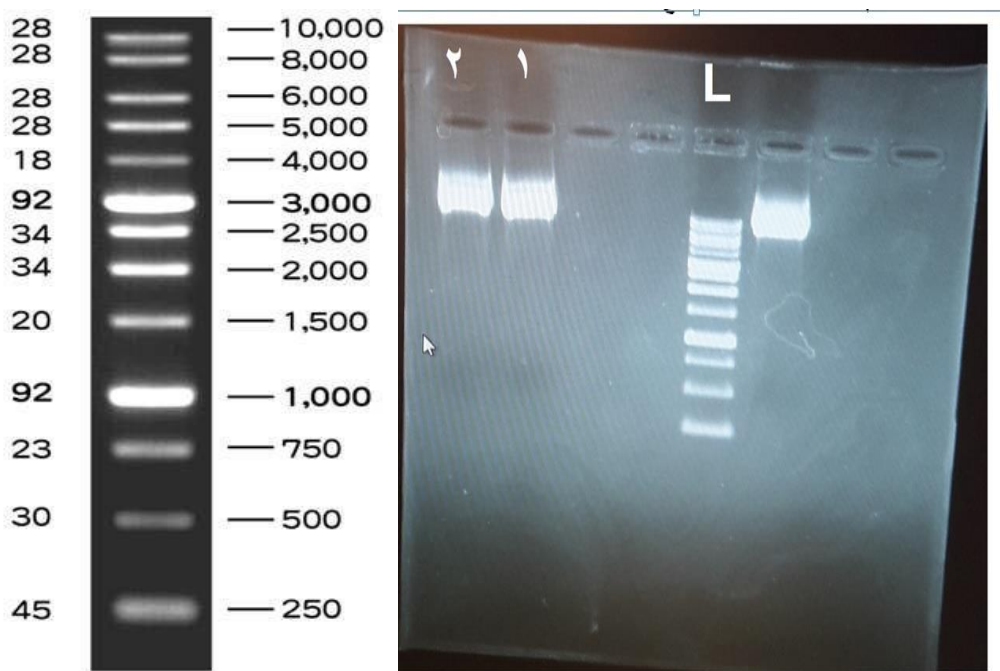
بعدی با  $MOI = 0.1$  تلقیح شد. یک چاهک هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که هیچ‌گونه رنگ فلورسانتی به آن اضافه نشد و در نهایت چاهک آخر به عنوان کنترل بود که رنگ PI و انکسین به آن اضافه شد.

**ترانسفکشن پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 به سلول‌های Caco<sub>2</sub> با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و تلقیح با ویروس رئو ( $MOI = 1$  و  $MOI = 0.1$ ):**

پس از ترانسفکشن سلول‌ها، وضعیت بیان ژن در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن توسط میکروسکوپ فلورسنت انجام شد که بر حسب زمان به دست آمده در مرحله بهینه‌سازی، پس از ۷۲ ساعت MAGE-A3 بهتر بیان شد. پس از ۷۲ ساعت محیط را خارج کرده و چاهک‌ها را یکبار با PBS شست‌وشو داده و بعد ویروس رئو با  $MOI = 1$  و  $MOI = 0.1$  به چاهک‌ها اضافه شد. از مجموع چاهک‌های پلیت، پنج چاهک با MAGE-A3 ترانسفکشن شدند که ویروس رئو با  $MOI = 1$  و  $MOI = 0.1$  به چهار چاهک تلقیح شد و به یکی از چاهک‌هایی که ترانسفکشن شده بود ویروس رئو تلقیح نشد. به دو چاهک پلیت نیز فقط ویروس رئو با  $MOI = 1$  و  $MOI = 0.1$  تلقیح شد. یک چاهک به عنوان شاهد و چاهک آخر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت بعد از تلقیح رئو ویروس و مشاهده CPE سلول‌ها برای بررسی آپوپتوز جمع شده و با روش فلوسایتومتری سنجیده شدند.

**بررسی رده‌های سلولی از نظر القای آپوپتوز با روش فلوسایتومتری:**

این تست طبق پروتکل کیت شرکت (Annexin V Apoptosis Detection kit FITC) eBioscience انجام شد. بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی دوگانه (Annexin-V/PI) انجام می‌شود. انکسین V یک پروتئین ضد انعقادی است که در حضور کلسیم با تمایل بالایی به فسفاتیدیل سرین متصل می‌شود و کونژوگه این پروتئین با رنگ فلوروسین ایزوتیوسیانات (FITC) سبب تشخیص آپوپتوز در مراحل اولیه می‌شود و رنگ پروپیدیوم (PI) که رنگ اختصاصی DNA است، با تغییر نفوذپذیری



شکل ۱- الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید

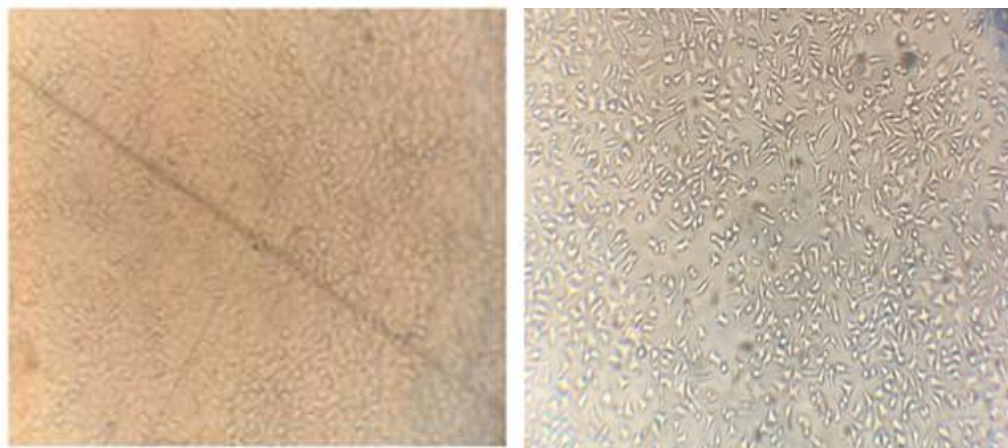
ستون ۱، ۲ و ۶ پلاسمید با اندازه ۶۷۴۶ جفت باز و ستون ۵ مارکر DNA ۱۰ کیلوبازی

#### تیتراژ رتروویروس به روش $CCID_{50}$ :

تیتراژ رتروویروس بر اساس آثار CPE (شکل ۲) با استفاده از روش

رید - مانچ، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح ویروس روی سلول L929 به میزان  $10^{6.2} CCID_{50}/\mu l$  محاسبه شد.

#### L929



شکل ۲- تصویری از سلول‌های L929 کشت داده شده در مواجهه و بدون مواجهه با ویروس رترو ویروس زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $10\times$ . تصویر سمت چپ سلول L929 بدون تلقیح با رترو ویروس و تصویر سمت راست سلول‌های L929 تلقیح شده با رترو ویروس (تیتراژ  $10^{6.2}$ ) زیر میکروسکوپ نوری پس از ۲۴ ساعت با بزرگنمایی  $10\times$

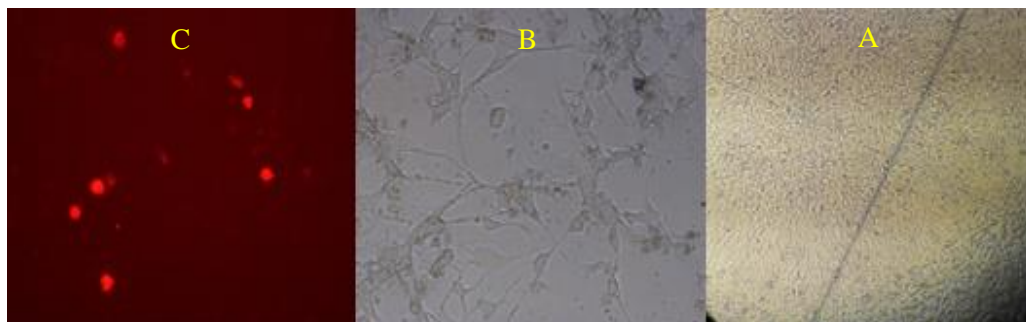
#### بررسی میزان کارایی ترانسفکشن:

سلول‌ها قبل و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. بررسی و شمارش

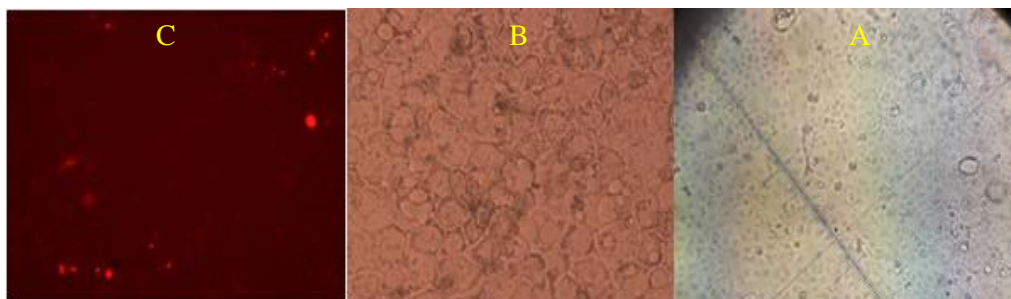
سلول‌های دارای فلورسنت نشان‌دهنده حدود ۳۰ الی ۴۰ درصد کارایی ترانسفکشن بود (تقریباً در هر فیلد تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های ترانسفکت شده محاسبه شد). شکل ۳ و ۴ نمایی

هستند که احتمال انتقال پلاسمید به خصوص با اندازه‌های نسبتاً بزرگ به درون آنها سخت می‌باشد

از سلول‌های ترانسفکت شده که دارای فلورسانت قرمز (نارنجی) هستند را زیر میکروسکوپ فلورسنت نشان می‌دهد. سلول CT26 و به خصوص سلول Caco<sub>2</sub> از آن دسته سلول‌هایی



شکل ۳- مشاهده میزان بیان GFP در سلول‌های CT26 پس از ترنسفکشن با وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 توسط میکروسکوپ فلورسنت  
شکل A: شمای کلی سلول CT26 قبل از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 شکل B: سلول CT26 پس از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 زیر میکروسکوپ نوری شکل C: سلول CT26 پس از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGEA3 زیر میکروسکوپ فلورسنت



شکل ۴- مشاهده میزان بیان GFP در سلول‌های Caco<sub>2</sub> پس از ترنسفکشن با وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 توسط میکروسکوپ فلورسنت  
شکل A: شمای کلی سلول Caco<sub>2</sub> قبل از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3. شکل B: سلول Caco<sub>2</sub> پس از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 زیر میکروسکوپ نوری. شکل C: سلول Caco<sub>2</sub> پس از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 زیر میکروسکوپ فلورسنت

MOI = ۱ ۳۸/۵ درصد و  $p\text{-value} < ۰/۰۲$  در  $MOI = ۰/۰۱$  ۳۰ درصد و  $p\text{-value} < ۰/۰۰۵$  در مقایسه با سلول‌های تلقیح شده با ویروس رئو (بدون حضور MAGE-A3) (در  $MOI = ۱$ ، ۲۲/۴ و  $MOI = ۰/۰۱$ ، ۱۵/۸) افزایش یافته است (جدول ۱ و نمودار ۵).

یافته‌های آپوپتوز سلول CT26 پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE-A3 و تلقیح با ویروس در  $MOI = ۱$  و  $۰/۰۱$  با روش فلوسایتومتری:

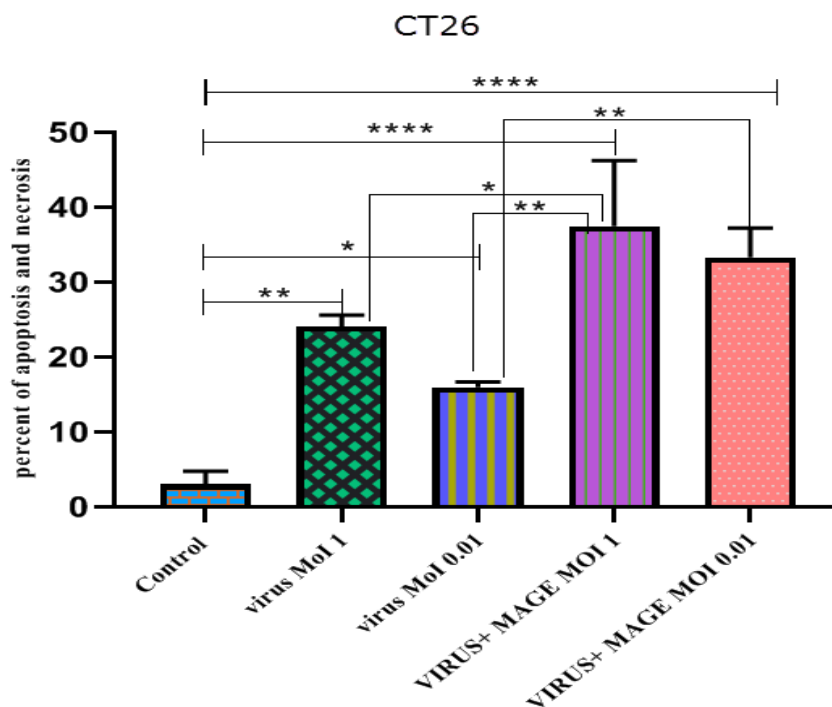
با توجه به اینکه ۷۲ ساعت پس از ترنسفکشن بیشترین میزان بیان پروتئین مشاهده شد، این زمان برای تلقیح ویروس انتخاب شد و همچنین با توجه به اینکه ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس حدود ۵۰ درصد سلول‌ها آثار CPE را نشان دادند، بنابراین ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس به سلول‌های ترانسفکت شده، سلول‌ها رنگ‌آمیزی و توسط فلوسایتومتر بررسی شدند. نتایج نشان می‌دهد که میزان آپوپتوز در سلول‌های CT26 مواجه شده با وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 و آلوده شده با ویروس رئو (در



جدول ۱- نتایج حاصل از مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه تست فلوسایتومتری روی سلول CT26 طی ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس

| میزان درصد مرگ سلولی* ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس رتو | گروهها                              |
|---|-------------------------------------|
| ۰/۷   | کنترل                               |
| ۱/۸   | شاهد بدون رنگ (UN)                  |
| ۳۸/۵  | سلول + پلاسمید + رتو ویروس ۱ MOI    |
| ۳۰  | سلول + پلاسمید + رتو ویروس ۰/۰۱ MOI |
| ۱۵/۸  | ویروس رتو ۰/۰۱ MOI                  |
| ۲۲/۴  | ویروس ۱ MOI                         |

\*درصد مرگ سلولی از مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس رتو به دست آمده است.



نمودار ۵- مقایسه نتایج آپوپتوز مربوط به سلول CT26 پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE-A3 و تلقیح با ویروس در ۱ MOI و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری.

نتایج به دست آمده با نرم افزار GraphPad Prism بررسی شده اند که درصد معناداری در مقایسه با هر گروه مشخص شده است ( $P < 0.02$ ), ( $P < 0.0001$ ), ( $P < 0.005$ ).

حدود ۵۰ درصد سلولها آثار CPE را نشان دادند، بنابراین ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس به سلولهای ترنسفکت شده، سلولها رنگ آمیزی و توسط فلوسایتومتر بررسی شدند. میزان آپوپتوز در سلولهای Caco<sub>2</sub> مواجه شده با وکتور بیان کننده MAGE-A3 و آلوده شده با ویروس رتو (در ۱ MOI = ۱/۸ ± ۲۲/۵ درصد و p-value = NS در ۰/۰۱ MOI = ۱۱ ± ۲)

یافته های آپوپتوز مربوط به سلول Caco<sub>2</sub> پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE-A3 و تلقیح با ویروس در ۱ MOI و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری:

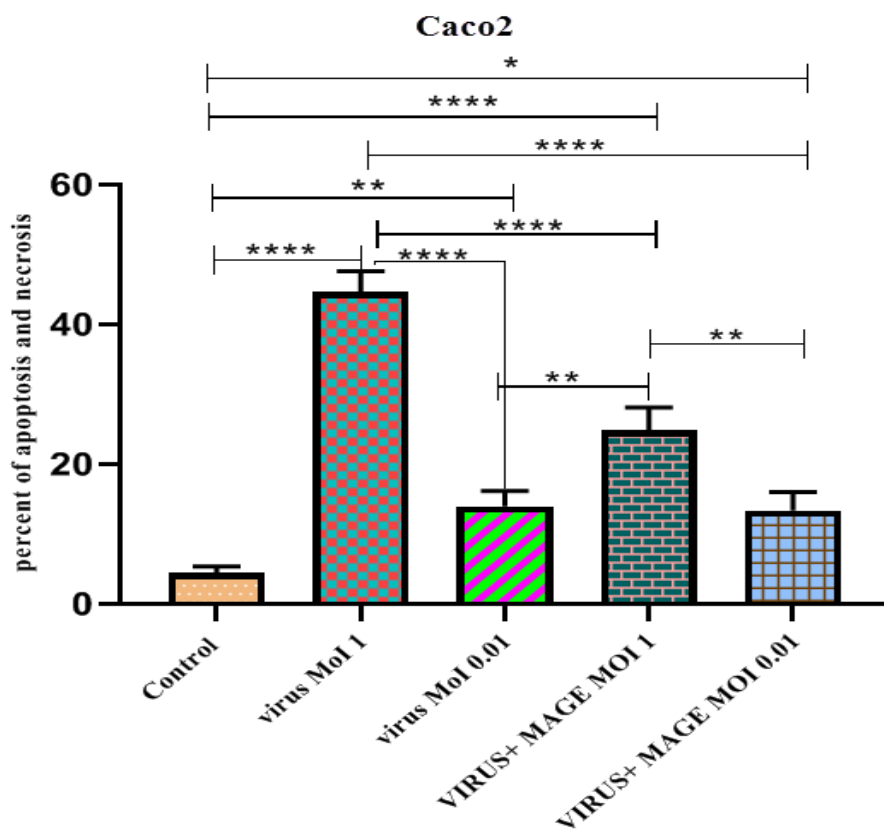
با توجه به اینکه ۷۲ ساعت پس از ترنسفکشن بیشترین میزان بیان پروتئین مشاهده شد، این زمان برای تلقیح ویروس انتخاب شد و همچنین با توجه به اینکه ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس

است (جدول ۲ و نمودار ۶). به علاوه مقایسه نتایج آپوپتوز اولیه و ثانویه حاصل از تست فلوسایتومتری در دو سلول Caco<sub>2</sub> و CT26 در جدول ۳ نشان داده شده است.

درصد و (p-value = NS) در مقایسه با سلول‌های تلقیح شده با ویروس رئو (بدون حضور MAGE-A3) (در ۱ MOI = ۲/۷ ± ۴۵/۵ درصد و ۰/۰۱ MOI = ۰/۹ ± ۱۱/۵ درصد) کاهش یافته

جدول ۲- نتایج حاصل از مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه تست فلوسایتومتری در سلول‌های Caco<sub>2</sub> مواجه شده با وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 در مقایسه با ویروس رئو (بدون حضور MAGE-A3) طی ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس.

| گروه‌ها                              | میزان درصد مرگ سلولی* ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس رئو |
|--------------------------------------|---|
| کنترل                                | ۴/۴ ± ۰/۵   |
| ویروس ۱ MOI:                         | ۴۵/۵ ± ۲/۷  |
| سلول + پلاسمید + ویروس ۱ MOI:        | ۲۲/۵ ± ۱/۸  |
| سلول + پلاسمید + رئو ویروس ۰/۰۱ MOI: | ۱۱ ± ۲  |
| ویروس ۰/۰۱ MOI:                      | ۱۱/۵ ± ۰/۹  |
| پلاسمید + Caco <sub>2</sub>          | ۱۲/۷ ± ۱/۷  |
| شاهد بدون رنگ (UN)                   | ۱/۱ ± ۰/۴   |



نمودار ۶- نمودار مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول Caco<sub>2</sub>

مقایسه نتایج آپوپتوز مربوط به سلول Caco<sub>2</sub> پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE و تلقیح با ویروس در ۱ MOI و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار GraphPad Prism بررسی شده‌اند که درصد معناداری در مقایسه با هر گروه مشخص شده است (P < ۰/۰۰۲\*\* , P < ۰/۰۰۱\*\*\*\* , P < ۰/۰۱\*).

### جدول ۳- مقایسه نتایج آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول Caco<sub>2</sub> و CT26 پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE و تلقیح با ویروس در MOI ۱ و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری

| میزان درصد آپوپتوز در Caco <sub>2</sub> | میزان درصد آپوپتوز در CT26 | گروه‌ها                          |
|---|----------------------------|----------------------------------|
| I/I                                     | O/O                        | (UN) شاهد                        |
| ۴/۴ ± ۰/۱                               | ۱/۸ ± ۰/۲                  | کنترل                            |
| ۴۵/۵ ± ۱/۷                              | ۲۲/۴ ± ۰/۹                 | ویروس ۱: MOI                     |
| ۱۱/۵ ± ۱/۵                              | ۱۵/۸ ± ۰/۳                 | ویروس ۰/۰۱: MOI                  |
| ۲۲/۵ ± ۱/۹                              | ۳۸/۵ ± ۳/۸                 | سلول + پلاسمید + ویروس ۱: MOI    |
| ۱۱ ± ۱/۹                                | ۳۰ ± ۲/۱                   | سلول + پلاسمید + ویروس ۰/۰۱: MOI |

## بحث

افزایش آپوپتوز در سلول‌ها در اثر بیان MAGE-A3 بود. این مسئله از چند جنبه قابل بررسی است که به آنها می‌پردازیم. با وجود گزارش‌های متعدد مبنی بر تأثیر MAGE-A3 بر سرطان‌زایی و ممانعت از آپوپتوز Xinli Liu و همکاران در سال ۲۰۱۵ در چین با فرض اینکه بیان افزایشی کالرتیکولین (CALR)، که یک چارپون شبکه اندوپلاسمی است و MAGE-A3 ممکن است پرولیفراسیون و تهاجم سلول‌های سرطان ریه سلول غیر کوچک (NSCLC) را مهار کند مطالعه‌ای را طراحی کردند. داده‌های مطالعه آنها نشان داد که بیان افزایش یافته CALR و بیان افزایشی MAGEA3 سبب مهار تکثیر و تهاجم سلول‌های A549 به عنوان مدل سلولی NSCLC شده که با افزایش سیتوتوکسیسیته CTL اختصاصی MAGE-A3 سبب آپوپتوز قابل توجه این سلول‌ها می‌شود (۱۵). آنها پیشنهاد کردند که MAGE-A3 ممکن است در ER تجمع یابد و سبب تقویت استرس ER در سلول‌های A549 شود. این عوامل ممکن است به طور هم‌افزایی فعال‌سازی AKT را کاهش دهند، که سبب کاهش ERK1/2، NF-κB، فسفوریلاسیون و بیان سیکلین D1 می‌شود و به مهار تکثیر سلولی A549 و تحریک آپوپتوز سلول‌های A549 منجر می‌شود. علاوه بر این، بیان CALR یا MAGE-A3 سبب افزایش فعال‌سازی DC در شرایط *in vitro* و افزایش سیتوتوکسیسیته CTL های ترشح‌کننده IFN-γ

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آپوپتوز در سلول‌های سرطانی با استفاده از ویروس اونکولیتیک رتو در همراهی با آنتی‌ژن توموری MAGE به عنوان فاکتوری برای تحریک سیستم ایمنی، بسته به نوع سلول و عوامل بیان‌شونده در سلول ممکن است بسیار متفاوت باشد. فعالیت کشندگی رتو ویروس در سلول CT26 در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 نسبت به عدم حضور وکتور، بیشتر بود (تقریباً دو برابر). از طرفی میزان آپوپتوز ناشی از فعالیت ویروس در سلول Caco<sub>2</sub> در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 و نسبت به نبود وکتور کمتر بود. در واقع میزان آپوپتوز حاصل از تلقیح ویروس رتو در سلول Caco<sub>2</sub> تقریباً دو برابر حالتی بود که MAGE-A3 در سلول بیان می‌شود. در کل میتوان چنین بیان کرد که با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه تأثیر کشندگی توسط ویروس رتو در رده سلولی، Caco<sub>2</sub> بیشتر از سلول CT26 است و همچنین میزان کشندگی سلول در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 در سلول CT26 تقریباً دو برابر حالتی است که این وکتور در سلول Caco<sub>2</sub> وجود دارد. استفاده از آنتی‌ژن MAGE به عنوان محرک ایمنی ضد تومور در درمان سرطان به همراه ویروس‌های اونکولیتیک نتایج امید بخشی را در مطالعه‌های قبل به دنبال داشته است (۱۳، ۱۴). با توجه به اینکه نتایج حاصل حاکی از

کمبود p53 در بعضی سلول‌ها، آنها را مستعد عفونت با رتو ویروس می‌کند و اینکه ویروس رتو ترجیحاً سلول‌های سرطانی فاقد p53 را در مقایسه با سلول‌های همتای طبیعی آنها آلوده می‌کند (۱۹). Pan و همکاران (۲۰۱۱) متعاقباً نشان دادند که تفاوت معناداری در تیترا ویروس در سلول‌های HCT116 +/+ و p53 و سلول‌های p53 -/- وجود ندارد، اما تیمار سلول‌های A549 دارای p53 تیپ وحشی با Nutlin-3a (آنالوگ و تخریب‌کننده MDM2 و افزایش‌دهنده بیان RNA و پروتئین P53) سبب افزایش مرگ سلولی ناشی از رتو ویروس می‌شود (۲۰). مطالعه Xiaozhan Zhang در سال ۲۰۱۵ نشان داد که p53 سبب تقویت تکثیر رتو ویروس در سلول‌های A549 می‌شود (۲۱). بنابراین، عملکرد p53 ممکن است به نوع سلول بستگی داشته باشد. مکانیسم مولکولی دقیق که توسط آن p53 سبب تنظیم تکثیر رتو ویروس می‌شود، باید بیشتر بررسی شود. علاوه بر این، شواهدی از ارتباط بین پروتئین MAGE-I و p53 از نمونه‌های متعلق به بیماران مبتلا به تومورهای مختلف وجود دارد. به عنوان مثال، آنالیز نمونه‌های سرطان تیروئید انسانی (که اغلب دارای نوع وحشی p53 اند) نشان داد که سلول‌های توموری در مقایسه با بافت‌های طبیعی تیروئید بیان افزایش یافته MAGE سیتوپلاسمی را دارند. از طرف دیگر، گزارش شد که بیان سیتوپلاسمی MAGE با کاهش تعداد هسته‌های p53 مثبت ارتباط دارد (۲۲). جالب است بدانیم که پروتئین‌های MAGE-II از قبیل NECDIN و MAGED1 می‌توانند عملکردهای سلولی را بر خلاف پروتئین MAGE-I انجام دهند. به عنوان مثال، گزارش شده است که MAGE-D1 فعالیت رونویسی p53 را فعال می‌کند. بنابراین، برخی از پروتئین‌های MAGE-II می‌توانند فعالیت اعضای خاصی از MAGE-I را بی‌اثر کنند و بالعکس، مطالعه‌ها در این زمینه می‌تواند نمای جدیدی از عملکرد شبکه پروتئین MAGE را نشان دهد (۲۲).

مطالعه حاضر بر این واقعیت تأکید کرد که استفاده از روش‌های نوین برای درمان سرطان به‌خصوص در مواردی که دو یا چند روش درمانی به صورت توأم به کار می‌رود باید با توجه به

اختصاصی MAGE-A3 در سلول‌های A549 می‌شود. در نهایت نتیجه گرفتند یافته‌های آنها ممکن است زمینه جدیدی را برای طراحی ایمنی درمانی ضد تومور برای مداخله NSCLC فراهم کند (۱۵). این داده‌های به دست آمده منطبق با یافته‌های پیشین آنها بود که نشان می‌داد بیان افزایش یافته CALR و MAGE-A3 از تکثیر و تهاجم سلول‌های گلیوبلاستوما جلوگیری می‌کند (۱۶). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که MAGE در سلول‌های مختلف می‌تواند نقش تحریک‌کننده یا ممانعت‌کننده از آپوپتوز را داشته باشد. می‌توان پیشنهاد کرد که نتایج حاصل در این تحقیق تا حدی می‌تواند وابسته به نوع سلول باشند و بر اساس اینکه چه پروتئین‌هایی در هر سلول سرطانی بیان می‌شود، نتیجه می‌تواند متفاوت باشد.

وضعیت چند ژن مهم مثل RAS و p53 در باره دو سلول CT26 و Caco2 قابل بررسی است. پروتئین P53 در سلول‌های CT26 به شکل سالم و در سلول‌های Caco2 به شکل موتانت است و پروتئین Ras در سلول‌های CT26 به شکل موتانت و در سلول‌های Caco2 سالم است (۱۱، ۱۷). با مشاهده پروفایل بیان ژن به نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل از نظر ارتباط با ویروس رتو پروتئین Ras و یکی از فاکتورهایی است که در اونکولایتیک بودن ویروس رتو نقش مؤثر دارد. نقش عملکردی Ras و MAGE با یکدیگر گزارش نشده است، ولی دیده شده که میزان بیان‌شان با هم ارتباط مثبت دارد به طوری که در یک مطالعه مشخص شد بیان MAGEA4 ارتباط مثبت قوی با بیان E-ras دارد (۱۸). پس احتمال دارد که Ras در این مشاهده ما بیشتر از p53 دخیل باشد. با توجه به نقش Ras در افزایش فعالیت رتو ویروس و همسو بودن افزایش آن با کاهش بیان MAGE و از طرفی بیان فرم کارآمد Ras در سلول Caco2 و موتانت آن در سلول CT26 می‌توان احتمال داد که فعالیت MAGE و تأثیر آن در خاصیت اونکولایتیکی ویروس رتو بیش از آنکه با p53 مرتبط باشد با Ras در ارتباط است. برخی مطالعه‌ها گزارش کرده‌اند که p53 بر oncolysis توسط ویروس رتو تأثیر می‌گذارد. کیم و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که

## تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافی را گزارش نکرده‌اند.

مکانیسم‌هایی مؤثر در هر یک از روش‌ها و عوامل دخیل برای اثرگذاری فاکتورهای درمانی مورد ارزیابی و استفاده توأم قرار گیرند. این فاکتورها حتی در یک نوع سرطان از رده‌های مختلف ممکن است متفاوت بوده و تأثیر مختلفی بر روند درمان ایجاد کند. بنابراین از جنبه‌های با ارزش این پژوهش علاوه بر بررسی تأثیر آنتی‌ژن MAGE بر فعالیت ویروس رئو دستیابی و تأکید بیشتر بر این واقعیت است که در درمان سرطان باید به خصوصیات منحصر به فرد هر رده سرطانی در افراد مختلف توجه ویژه کرد. از محدودیت‌های مطالعه می‌توان به میزان کارایی کم ترانسفکشن پلاسمید MAGE-A3 به سلول‌های مطالعه شده و نبود بررسی بیان P53 و RAS در سلول‌های مطالعه شده اشاره کرد.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که با توجه به میزان کشندگی بالاتر ویروس رئو در سلول‌های Caco<sub>2</sub> نسبت به CT26 و وضعیت ژن‌های P53 و Ras در این دو سلول به نظر می‌رسد که در سلول‌های Caco<sub>2</sub> که در آنها بر خلاف CT26، P53 موتانت، ولی Ras فعال است، ویروس فعالیت بیشتری داشته و حضور MAGE-A3 با کاهش فعالیت Ras، از فعالیت ویروس می‌کاهد.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه شماره ۷۵۸۵۷ خانم منا قلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ویروس‌شناسی پزشکی از دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بود. از مشارکت‌کنندگان محترم و تمامی بزرگوارانی که در اجرای پژوهش حاضر ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

## ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشگاه تربیت مدرس بررسی و با کد اخلاق IR.MODARES.REC.1397.19 ثبت شده است.

## References

- Rosendahl Huber A, Van Hoeck A, Van Boxel RJFiG. The mutagenic impact of environmental exposures in human cells and cancer: imprints through time. *Front Genet* 2021; 12: 2065.
- Dolatkhah R, Somi MH, Kermani IA, Ghojzadeh M, Jafarabadi MA, Farassati F, et al. Increased colorectal cancer incidence in Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2015;15(1):1-14.
- Haggar FA, Boushey RPJCic, surgery r. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg* 2009;22(04):191-7.
- Buijs PR, Verhagen JH, van Eijck CH, van den Hoogen BGJHv, immunotherapeutics. Oncolytic viruses: From bench to bedside with a focus on safety. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11(7):1573-84.
- Bolton G. Optimising Reovirus Type 3 Dearing (Reolysin®) as an Anti-cancer Therapeutic: University of Surrey (United Kingdom); 2016.
- Banijamali RS, Soleimanjahi H, Soudi S, Karimi HJJMM. The effect of oncolytic reovirus infection on nitric oxide secretion and induction of apoptosis in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2018;12(3):218-29.
- Kim J, Hall RR, Lesniak MS, Ahmed AUJV. Stem cell-based cell carrier for targeted oncolytic virotherapy: translational opportunity and open questions. *Viruses* 2015;7(12):6200-17.
- Zajac P, Schultz-Thater E, Tornillo L, Sadowski C, Trella E, Mengus C, et al. MAGE-A antigens and cancer immunotherapy. *Front Med (Lausanne)* 2017;4:18.
- Brichard VG, Godechal QJO. MAGE-A3-specific anticancer immunotherapy in the clinical practice. *Oncoimmunology* 2013;2(10):e25995.
- Hamidi-Fard M, Ataei-Pirkooh A, Aghasadeghi M, Kazemi RJIJoV. Purification of Human Reovirus in Monolayer of L-929 Cells. *J Virol Methods* 2019;13(1):35-40.
- Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, et al. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics* 2014;15(1):1-12.
- Lei C, Yang J, Hu J, Sun XJVS. On the calculation of TCID<sub>50</sub> for quantitation of virus infectivity. *Virology* 2021;36:141-4.
- Jonker DJ, Hotte SJ, Abdul Razak AR, Renouf DJ, Lichty B, Bell JC, et al. Phase I study of oncolytic virus (OV) MG1 maraba/MAGE-A3 (MG1MA3), with and without transgenic MAGE-A3 adenovirus vaccine (AdMA3) in incurable advanced/metastatic MAGE-A3-expressing solid tumours: CCTG IND. 214. *American Society of Clinical Oncology*; 2017.
- Pol JG, Atherton MJ, Bridle BW, Stephenson KB, Le Boeuf F, Hummel JL, et al. Development and applications of oncolytic Maraba virus vaccines. *Oncolytic Virother* 2018:117-28.
- Liu X, Sun N, Dong Y, Li J, Liu Y, Ren Y, et al. Anticancer effects of adenovirus-mediated calreticulin and melanoma-associated antigen 3 expression on non-small cell lung cancer cells. *Int Immunopharmacol* 2015;25(2):416-24.
- Liu X-L, Zhao D, Sun D-P, Wang Y, Li Y, Qiu F-Q, et al. Adenovirus-mediated delivery of CALR and MAGE-A3 inhibits invasion and angiogenesis of glioblastoma cell line U87. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31(1):1-10.
- Ahmed D, Eide P, Eilertsen I, Danielsen S, Eknaes M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2013;2(9):e71-e.
- Gordeeva O, Gordeev A, Khaydukov SJO. Expression dynamics of Mage family genes during self-renewal and differentiation of mouse pluripotent stem and teratocarcinoma cells. *Oncotarget* 2019;10(35):3248.
- Kim M, Williamson C, Prudhomme J, Bebb D, Riabowol K, Lee P, et al. The viral tropism of two distinct oncolytic viruses, reovirus and myxoma virus, is modulated by cellular tumor suppressor gene status. *Oncogene* 2010;29(27):3990-6.
- Pan D, Pan L, Hill R, Marcato P, Shmulevitz M, Vassilev L, et al. Stabilisation of p53 enhances reovirus-induced apoptosis and virus spread through p53-dependent NF-κB activation. *Br J Cancer* 2011;105(7):1012-22.
- Zhang X, Wu H, Liu C, Tian J, Qu LJI, Genetics, Evolution. PI3K/Akt/p53 pathway inhibits reovirus infection. *Infect Genet Evol* 2015;34:415-22.
- Ladelfa MF, Peche LY, Toledo MF, Laiseca JE, Schneider C, Monte MJCl. Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function. *Cancer Lett* 2012;325(1):11-7