Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 2

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, researchon 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 ($Caco_2$) 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 $Caco_2$ 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 $Caco_2$ 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 $Caco_2$ cells.

Conclusion: Given the higher cytolysis of the virus in $Caco_2$ 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۲، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۷۵ تا ۸۸

بررسی تأثیر آنتی‌ژن توموری MAGE-A3 برفعالیت اونکولایتیکی 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 درحال 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 انکولایتیک 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 اونکولایتیکی ویروس رئو در رده‌های سلول توموری کولورکتال است.

روش کار: در این مطالعه تجربی از سلول L929 که جزو رده سلولی فیبروبلاست است به عنوان سلول میزبان برای تکثیر رئوویروس استفاده شد. تیتر رئو ویروس با روش CCID50 تعیین و تیتر مناسب برای مطالعه انتخاب شد. پلاسمید بیان کننده MAGEA3 به سلول‌های سرطان کولورکتال با منشأ موشی (CT26) و انسانی ($Caco_2$) 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 ۳/۸ ± ۳۸/۵ درصد و p-value < ۰/۰۲ / در MOI = ۰/۰۱ ۲/۱ ± ۳۰ درصد و p-value < ۰/۰۰۵) نسبت به نبود وکتور بیان‌کننده MAGE-A3، (در MOI = ۱ ۰/۹ ± ۲۲/۴ درصد و MOI = ۰/۰۱ ۰/۳ ± ۱۵/۸درصد) بیشتر بود. از طرفی میزان آپوپتوز در سلول $Caco_2$ در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE و آلوده شده با ویروس رئو (در MOI = ۱ ۱/۸ ± ۲۲/۵ درصد و p-value = NS / در MOI = ۰/۰۱ ۲ ± ۱۱ درصد و p-value = NS) نسبت به نبود وکتور بیان‌کننده MAGE-A3، (در MOI = ۱ ۲/۷ ± ۴۵/۵ درصد و MOI = ۰/۰۱ ۰/۹ ± ۱۱/۵درصد) کمتر بود. می‌توان چنین بیان کرد که با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه تأثیر سیتولیز توسط ویروس رئو در رده سلولی$Caco_2$ بیشتر از سلول CT26 است و همچنین میزان کشندگی سلول در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 در سلول CT26 تقریبا دو برابر حالتی است که این وکتور در سلول $Caco_2$ وجود دارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به میزان کشندگی بالاتر ویروس در سلول‌های $Caco_2$ 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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

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 به‌وجود می‌آید و در افرادی که سابقه خانوادگی دارند، احتمال ابتلا دو تا سه برابر می‌شود. علایم 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 هورمون درمانی 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 انکولایتیک (OV) بر اساس تکثیر انتخابی ویروس‌ها در سلول‌های سرطانی و گسترش آن درون تومور بدون آسیب رساندن به بافت طبیعی انجام می‌گیرد. ویروس‌های انکولایتیک شامل طیف وسیعی از ویروس‌های با ژنوم DNA و RNA هستند (۴). رئوویروس متعلق به خانواده رئوویریده بوده و یک ویروس RNA دار غیرپاتوژن انسانی است که خاصیت انکولایتیکی دارد. مطالعه‌های زیادی نیز نشان داده‌اند که رئو 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 رئوویروس 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 رئوویروس 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 CTA ها 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 ایمنوتراپی و ویروس درمانی بتواند کارآیی 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 آنتی ژن توموری MAGE-A3 بر فعالیت اونکولایتیکی ویروس رئو در رده‌های سلول توموری کولورکتال است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

روش کار

تحقیق حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی انجام شد.

تهیه پلاسمید MAGE-A3: پلاسمید pCMV3- OFPSpark-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 اثرمحدود 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 DH5α، 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 ۲۲۰ rpm 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 لاندا 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 ۲۲۰ rpm 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 (® ExprepTM 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 $Caco_2$ 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_2 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 داری جریان ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند. با ظهور آثار سیتوپاتیک تخریب سلولی (CPE) ناشی از عفونت ویروس رئو سلول‌ها طی سه بار انجماد و ذوب

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

تخریب و همراه با محیط واجد ویروس در ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محیط رویی دارای ویروس جمع‌آوری شد و به مقادیرکم تقسیم و بعد از تعیین تیتر، تا زمان استفاده در ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین تیتر رئو ویروس با روش CCID50 و انتخاب تیتر مناسب:

اساس این روش اندازگیری رقتی از ویروس است، که ۵۰ درصد از سلول‌های کشت را آلوده کند. برای تعیین عیار عفونی رئوویروس تک لایه‌ای از سلول‌های L929 در پلیت ۹۶ چاهکی تهیه شد. به طوری‌که در هر چاهک به میزان ۱×۱۰^{۴} 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 رئوویروس با محیط کشت تا $۱۰^{۹}$ 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 تیتر ویروس استفاده شد (۱۲).

ترانسفکشن پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 به سلول‌های CT26 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و تلقیح با ویروس رئو (MOI = ۱ و MOI = ۰/۰۱):

برای ورود پلاسمید حاوی ژن MAGE-A3، ابتدا سلول‌های CT26 در چاهک‌های پلیت ۲۴تایی 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 آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ترانسفکشن سلول‌ها با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen امریکا) 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 فلورسنس 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 رئو با MOI = ۱ و MOI = ۰/۰۱ 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 آپوپتوز جمع‌آوری و با روش فلوسایتومتری سنجیده شدند. از مجموع هشت چاهک، چهار چاهک با MAGE-A3 ترنسفکت شدند که به دو چاهک از آن ویروس رئو با MOI ۱ و به دو چاهک دیگر ویروس رئو با MOI ۰/۰۱ تلقیح شد. به یکی از دو چاهک دیگر که فقط حاوی سلول CT26 و محیط بودند ویروس رئو با MOI ۱ و به چاهک

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

بعدی با MOI ۰/۰۱ 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 $Caco_2$ با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و تلقیح با ویروس رئو (MOI = ۱ و MOI = ۰/۰۱):

پس از ترانسفکت کردن 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 = ۱ و MOI = ۰/۰۱ به چاهک‌ها اضافه شد. از مجموع چاهک‌های پلیت، پنج چاهک با MAGE-A3 ترنسفکت شدند که ویروس رئو با MOI ۱ و ۰/۰۱ به چهار چاهک تلقیح شد و به یکی از چاهک‌هایی که ترنسفکت شده بود ویروس رئو تلقیح نشد. به دو چاهک پلیت نیز فقط ویروس رئو با MOI ۱ و ۰/۰۱ تلقیح شد. یک چاهک به عنوان شاهد و چاهک آخر به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت بعد از تلقیح رئوویروس 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 فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) سبب تشخیص آپوپتوز در مراحل اولیه می‌شود و رنگ پروپیدیوم یدید (PI) که رنگ اختصاصی DNA است، با تغییر نفوذپذیری 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 rpm ۱۲۰۰ در دمای چهار درجه سانتریفیوژ شدند. 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 میکرولیتر 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:

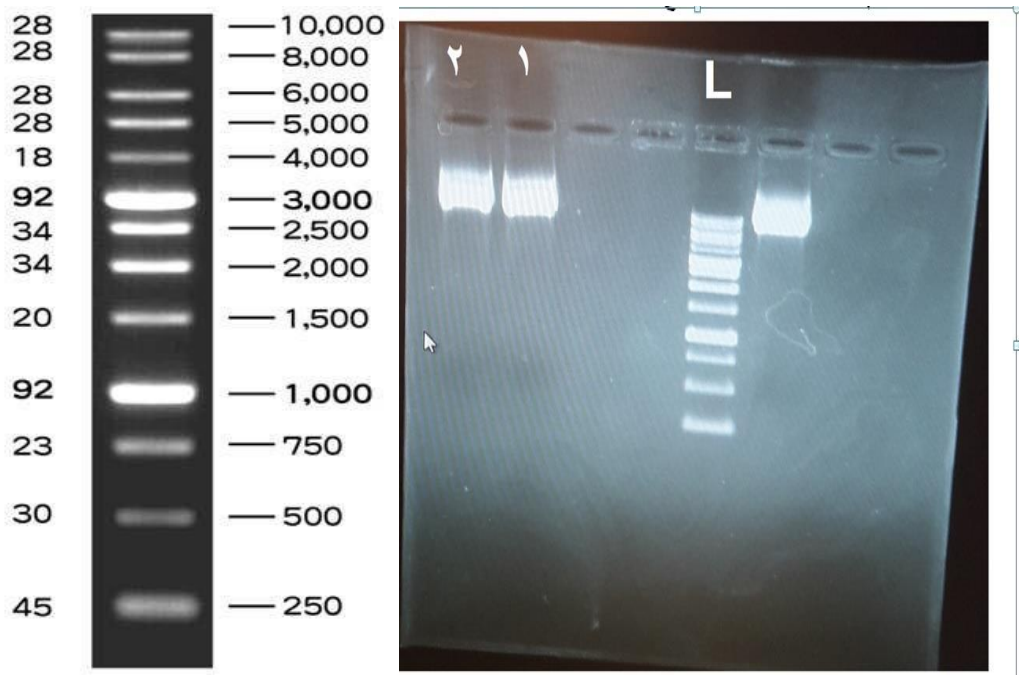
تمامی آزمون‌ها به صورت تکرارهای سه‌تایی انجام و داده‌ها به صورت میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد تکرار بر اساس سوابق آزمایش‌هایی که در شرایط مشابه انجام شده است، انتخاب شد. با توجه به شرایط یکسان و یکنواختی مواد آزمایش و کنترل نوسان‌های خطای آزمایش، تعداد سه تکرار انتخاب شد. از آزمون آماری تحلیل واریانس 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 ۸ انجام شد. $P < ۰/۰۵$ 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 کانامایسین کشت داده شدند و کلونی‌های حاصل پس از استخراج پلاسمید، از لحاظ دارا بودن وکتور مورد نظر بررسی شدند (شکل ۱).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

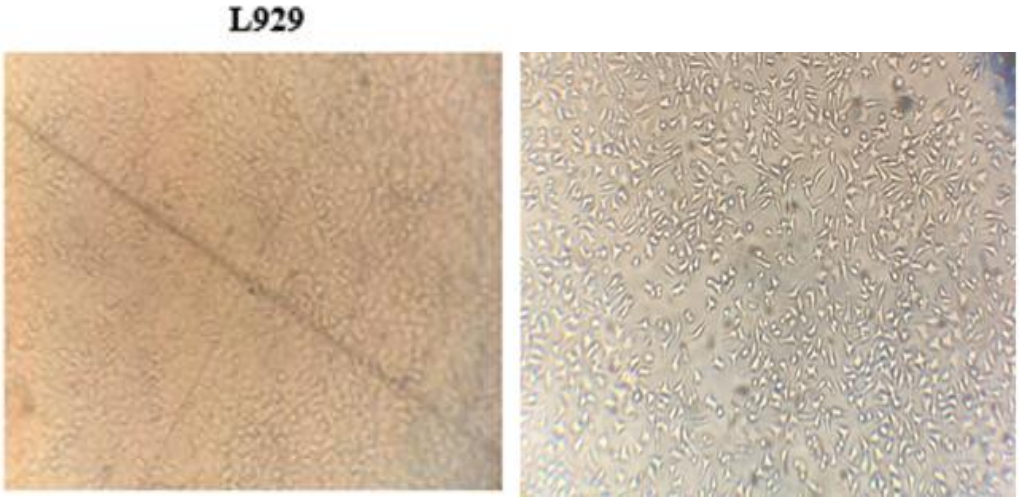


شکل ۱- الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید

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

تیتر رئوویروس به روش $CCID_{50}$:

تیتر رئوویروس بر اساس آثار CPE (شکل ۲) با استفاده از روش رید - مانچ، ۷۲ ساعت بعد از تلقیح ویروس روی سلول L929 به میزان $10^{6.2}$ CCID50/µl محاسبه شد.



شکل ۲- تصویری از سلول‌های L929 کشت داده شده در مواجهه و بدون مواجهه با ویروس رئو زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی×۱۰.

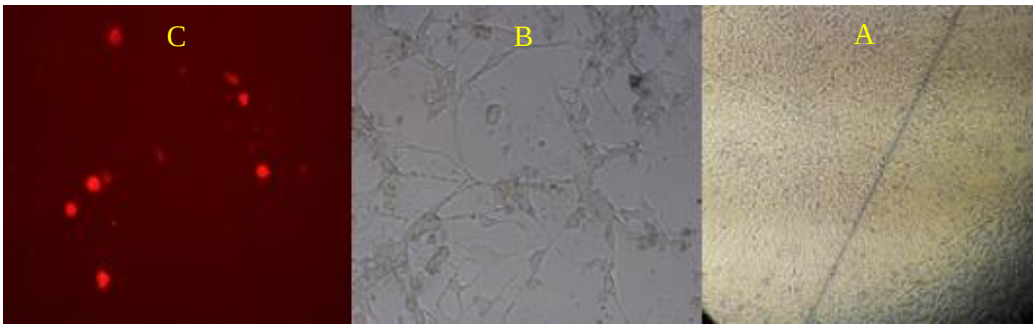
تصویر سمت چپ سلول L929 بدون تلقیح با رئو ویروس و تصویر سمت راست سلول‌های L929 تلقیح شده با رئو ویروس MOI:1 (تیتر $10^{6.2}$) زیر میکروسکوپ نوری پس از ۲۴ ساعت با بزرگنمایی×۱۰

بررسی میزان کارایی ترانسفکشن:

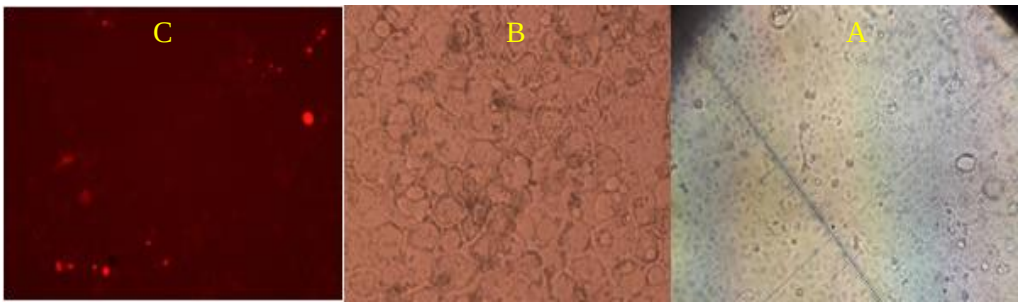
سلول‌ها قبل و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. بررسی و شمارش سلول‌های دارای فلورسنت نشان‌دهنده حدود ۳۰ الی ۴۰ درصد کارایی ترانسفکشن بود (تقریباً در هر فیلد تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های ترانسفکت شده محاسبه شد). شکل۳ و ۴ نمایی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

از سلول‌های ترانسفکت شده که دارای فلورسانت قرمز (نارنجی) هستند را زیر میکروسکوپ فلورسنت نشان می‌دهد. سلول CT26 و به خصوص سلول $Caco_2$ از آن دسته سلول‌هایی هستند که احتمال انتقال پلاسمید به خصوص با اندازه‌ای نسبتاً بزرگ به درون آنها سخت می‌باشد



شکل ۳- مشاهده میزان بیان OFP 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 OFP در سلول‌های $Caco_2$ پس از ترنسفکت کردن با وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 توسط میکروسکوپ فلورسنت
شکل A: شمای کلی سلول $Caco_2$ قبل از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3. شکل B: سلول$Caco_2$ پس از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 زیر میکروسکوپ نوری. شکل C: سلول $Caco_2$ پس از ترنسفکشن با پلاسمید بیان‌کننده MAGE-A3 زیر میکروسکوپ فلورسنت

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:

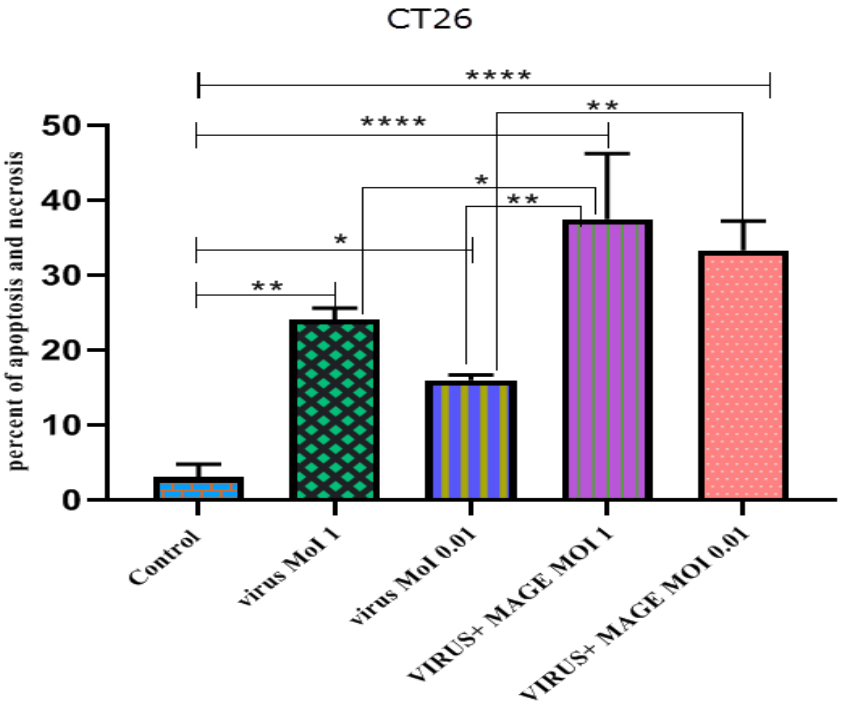
با توجه به اینکه ۷۲ ساعت پس از ترنسفکشن بیشترین میزان بیان پروتئین مشاهده شد، این زمان برای تلقیح ویروس انتخاب شد و همچنین با توجه به اینکه ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس حدود ۵۰ درصد سلول‌ها آثار CPE را نشان دادند، بنابراین ۲۰ساعت پس از تلقیح ویروس به سلول‌های ترنسفکت شده، سلول‌ها رنگ‌آمیزی و توسط فلوسایتومتر 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 MOI = ۱ ۳۸/۵ درصد و p-value < ۰/۰۲ در MOI = ۰/۰۱ ۳۰ درصد و p-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).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

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

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

*درصد مرگ سلولی از مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه ۲۰ ساعت پس از تلقیح ویروس رئو 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 MOI ۱ و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری.

نتایج به‌دست آمده با نرم‌افزار GraphPad Prism بررسی شده‌اند که درصد معناداری در مقایسه با هر گروه مشخص شده است (*P < ۰/۰۲, ****P < ۰/۰۰۰۱, **P < ۰/۰۰۵).

یافته‌های آپوپتوز مربوط به سلول $Caco_2$ پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE-A3 و تلقیح با ویروس در MOI ۱ و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری:

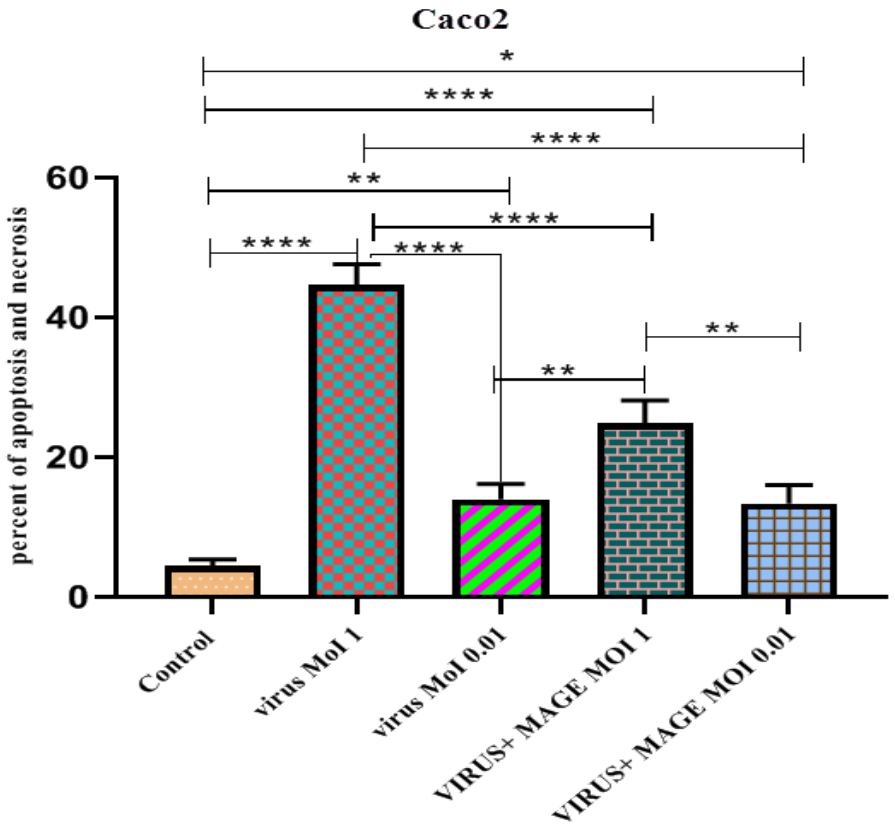
با توجه به اینکه ۷۲ ساعت پس از ترنسفکشن بیشترین میزان بیان پروتئین مشاهده شد، این زمان برای تلقیح ویروس انتخاب شد و همچنین با توجه به اینکه ۲۴ ساعت پس از تلقیح ویروس حدود ۵۰ درصد سلول‌ها آثار CPE را نشان دادند، بنابراین ۲۴ساعت پس از تلقیح ویروس به سلول‌های ترنسفکت شده، سلول‌ها رنگ‌آمیزی و توسط فلوسایتومتر بررسی شدند. میزان آپوپتوز در سلول‌های $Caco_2$ مواجه شده با وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 و آلوده شده با ویروس رئو (در MOI = ۱ ± ۱/۸ و ۲۲/۵ درصد و p-value = NS / در MOI = ۰/۰۱ ± ۲ ۱۱

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

درصد و p-value = NS) در مقایسه با سلول‌های تلقیح شده با ویروس رئو (بدون حضور MAGE-A3) (در MOI = ۱ ± ۲/۷ ۴۵/۵ درصد و MOI = ۰/۰۱ ± ۰/۹ ۱۱/۵درصد) کاهش یافته است (جدول ۲ و نمودار ۶). به‌علاوه مقایسه نتایج آپوپتوز اولیه و ثانویه حاصل از تست فلوسایتومتری در دو سلول $Caco_2$ و CT26 در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲- نتایج حاصل از مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه تست فلوسایتومتری در سلول‌های $Caco_2$ 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 MOI: ۱	۴۵/۵ ± ۲/۷
سلول + پلاسمید + ویروس MOI: ۱	۲۲/۵ ± ۱/۸
سلول + پلاسمید + رئو ویروس MOI: ۰/۰۱	۱۱ ± ۲
ویروس MOI: ۰/۰۱	۱۱/۵ ± ۰/۹
پلاسمید $Caco_{2+}$	۱۲/۷ ± ۱/۷
شاهد بدون رنگ (*UN*)	۱/۱ ± ۰/۴



نمودار ۶- نمودار مجموع آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول $Caco_2$

مقایسه نتایج آپوپتوز مربوط به سلول $Caco_2$ پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE و تلقیح با ویروس در MOI ۱ و ۱درصد با روش فلوسایتومتری. نتایج به‌دست آمده با نرم‌افزار GraphPad Prism بررسی شده‌اند که درصد معناداری در مقایسه با هر گروه مشخص شده است (*P < ۰/۰۱, ****P < ۰/۰۰۰۱, **P < ۰/۰۰۲).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

جدول ۳- مقایسه نتایج آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول $Caco_2$ و CT26 پس از ترنسفکشن با پلاسمید حاوی MAGE و تلقیح با ویروس در MOI ۱ و ۱ درصد با روش فلوسایتومتری

گروه‌ها	میزان درصد آپوپتوز در CT26	میزان درصد آپوپتوز در $Caco_2$
شاهد (UN)	*0/7*	*1/1*
کنترل	۱/۸ ± ۰/۲	۴/۴ ± ۰/۱
ویروس MOI: ۱	۲۲/۴ ± ۰/۹	۴۵/۵ ± ۱/۷
ویروس MOI: ۰/۰۱	۱۵/۸ ± ۰/۳	۱۱/۵ ± ۱/۵
سلول + پلاسمید + ویروس MOI: ۱	۳۸/۵ ± ۳/۸	۲۲/۵ ± ۱/۹
سلول + پلاسمید + ویروس MOI: ۰/۰۱	۳۰ ± ۲/۱	۱۱ ± ۱/۹

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آپوپتوز در سلولهای سرطانی با استفاده از ویروس اونکولیتیک رئو 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 رئو 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 $Caco_2$ در حضور وکتور بیان‌کننده MAGE-A3 و نسبت به نبود وکتور کمتر بود. در واقع میزان آپوپتوز حاصل از تلقیح ویروس رئو در سلول $Caco_2$ 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 رئو در رده سلولی، $Caco_2$ 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 $Caco_2$ 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 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 چاپرون 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

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 داده های 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 $Caco_2$ قابل بررسی است. پروتئین P53 در سلول های CT26 به شکل سالم و در سلول‌های Caco2 به شکل موتانت است و پروتئین Ras در سلول‌های CT26 به شکل موتانت و در سلول‌های $Caco_2$ سالم است (۱۱، ۱۷). با مشاهده پروفایل بیان ژن به نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل از نظر ارتباط با ویروس رئو پروتئین Ras و یکی از فاکتورهایی است که در اونکولایتیک بودن ویروس رئو 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 طوری‌که 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 رئو ویروس و همسو بودن افزایش آن با کاهش بیان MAGE و از طرفی بیان فرم کارآمد Ras در سلول $Caco_2$ و موتانت آن در سلول CT26 می‌توان احتمال داد که فعالیت MAGE و تأثیر آن در خاصیت اونکولایتیکی ویروس رئو بیش از آنکه با p53 مرتبط باشد با Ras در ارتباط است. برخی مطالعه‌ها گزارش کرده‌اند که p53 بر oncolysis توسط ویروس رئو تأثیر می‌گذارد. کیم و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که کمبود p53 در بعضی سلول‌ها، آنها را مستعد عفونت با رئو ویروس می‌کند و اینکه ویروس رئو 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 تیتر ویروس در سلول‌های HCT116 + / + 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 رئو ویروس می‌شود (۲۰). مطالعه Xiaozhan Zhang در سال ۲۰۱۵ نشان داد که p53 سبب تقویت تکثیر رئو 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 رئوویروس 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 p53اند) 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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

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 تاکید 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 $Caco_2$ نسبت به CT26 و وضعیت ژن‌های P53 و Ras در این دو سلول به نظر می‌رسد که در سلول‌های $Caco_2$ 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.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

References

1. Rosendahl Huber A, Van Hoeck A, Van Boxtel RJFiG. The mutagenic impact of environmental exposures in human cells and cancer: imprints through time. Front Genet 2021; 12: 2065.

2. Dolatkhah R, Somi MH, Kermani IA, Ghojazadeh 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.

3. Haggar FA, Boushey RPJCic, surgery r. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg 2009;22(04):191-7.

4. 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.

5. Bolton G. Optimising Reovirus Type 3 Dearing (Reolysin®) as an Anti-cancer Therapeutic: University of Surrey (United Kingdom); 2016.

6. Banijamali RS, Soleimanjahi H, Soudi S, Karimi HJIJMM. 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.

7. 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.

8. 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.

9. Brichard VG, Godechal QJO. MAGE-A3-specific anticancer immunotherapy in the clinical practice. Oncoimmunology 2013;2(10):e25995.

10. 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.

11. 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.

12. Lei C, Yang J, Hu J, Sun XJVS. On the calculation of TCID 50 for quantitation of virus infectivity. Virol Sin 2021;36:141-4.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. Gordeeva O, Gordeev A, Khaydukov SJO. Expression dynamics of Mage family genes during self-renewal and differentiation of mouse pluripotent stem and teratocarcinoma cells. Oncotarget2019;10(35):3248.

19. 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.

20. 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.

21. 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.

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

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]