Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۶ شماره ۱ بهار ۹۸ (۵۶-۴۴)

مقاله پژوهشی

اثر آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدبر بیان ژن *VEGF A* در رده‌های سلولی AML

مهناز محمدی کیان[۱]، سعید محمدی[۲]، محمود تولایی[۳]، مرتضی صادقی[۴]، محسن نیکبخت[۵]

چکیده

سابقه و هدف

آرسنیک تری‌اکساید اثرات ضد سرطانی روی طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها داشته است و عمدتاً با راه انداختن آپوپتوز در سلول‌های سرطانی عمل می‌کند. تالیدومایدبه عنوان مهارکننده رگ‌زایی مانع افزایش حیات در سلول‌ها می‌شود. هدف اصلی در این مطالعه، بررسی اثر ترکیبی آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدبر روی سطح بیان ژن *VEGF A* بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، آزمایش MTT برای بررسی اثر آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدبر مهار رشد سلول‌های KG-1 و U937 استفاده شد. دوزهای آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدبه صورت تک و در ترکیب با هم در زمان‌های متفاوت بررسی شدند. بررسی آپوپتوز سلولی از طریق فلوسیتومتری انجام شد و بعد از آن اثر این دو دارو بر بیان ژن *VEGF A* از طریق Real Time PCR صورت گرفت. از آزمون آماری student-t test، ANOVA و نرم‌افزار SPSS ۱۷ برای تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد.

یافته‌ها

دوز انتخابی آرسنیک تری اکساید در رده سلولی KG-1 و U937 به ترتیب برابر با ۱/۶۱۸ µM و ۱ µM و دوز انتخابی تالیدومایدبه در رده سلولی KG-1 و U937 به ترتیب برابر با ۸۰ µM و ۶۰ µM به دست آمد. همراهی دوزهای انتخابی این دو دارو با هم اثر کشندگی بیشتری بر هر دو رده سلولی نشان داد. از طرفی بیان ژن *VEGF A* در زمان اثردهی هر دو دارو کاهش قابل توجهی داشت.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *VEGF A* در رده سلولی KG-۱ و U937 کاهش یافته و اثر این دو دارو بر روی سلول‌ها باعث القای آپوپتوز شده است. برای تایید این نتایج، بررسی بیشتر در سطح پروتئین لازم است.

کلمات کلیدی

آرسنیک، تالیدومایدبه، لوسمی میلوئیدی حاد

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/ ۱

۱- کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی ـ مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران
۲- دکترای تخصصی هماتولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۳- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی ـ استاد مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران
۴- دکترای تخصصی ژنتیک ـ استادیار مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله(عج) ـ تهران ـ ایران
۵- مؤلف مسئول: دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ خیابان کارگر شمالی ـ بیمارستان شریعتی ـ ایران ـ کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۳۱

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد(AML) یکی از شایع‌ترین لوسمی‌ها در بالغین محسوب می‌شود که از کشندگی زیادی نیز برخوردار است(۱). پیش‌آگهی برای بالغین اغلب بد است به نحوی که بقای کلی بلند مدت(OS = Overall Survival) برای بیماران جوان‌تر حدود ۴۰ تا ۵۰ درصد بوده و برای بیماران در سنین بالاتر، به طور متوسط کمتر از یک سال است(۲). فاکتور رشد VEGF (Vascular endothelial growth factor)، فاکتور به نسبت جدیدی است، که قابلیت‌های بیولوژیک بسیار متنوعی را داراست. رگ‌زایی در تومور به VEGF بستگی دارد، بسیاری از رده‌های سلولی توموری در *In vitro* ، VEGF را ترشح می‌کنند(۴، ۳). تولید VEGF و رسپتورش به طور مستقیم میزان رگ‌زایی در تومور را کنترل می‌کنند. با توجه به این که VEGF نقطه استراتژیکی در تنظیم رگ‌زایی در تومور است، هدف مهمی در وقایع درمانی محسوب می‌گردد(۶، ۵). استفاده از آنتی‌بادی بر علیه VEGF و رسپتور آن و یا استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کیناز، نتایج مطلوبی در مطالعه‌های کلینیکی در ارتباط با درمان تومورها داشته است(۷). داروها با اساس آرسنیک به عنوان عوامل شیمی درمانی مؤثر برای درمان بیماری‌های مختلف و برخی از تومورها استفاده شده است. در سال‌های اخیر As2O3 به عنوان یک ماده ضد لوسمی بسیار قوی به خصوص در برابر لوسمی پرومیلوسیتی حاد(APL) شناخته شده است(۸). آرسنیک تری‌اکسید در دوزهای پایین به تنهایی نمی‌تواند موجب القای آپوپتوز شود و برای حذف سلول‌های توموری با آن دوزهای بالا نیاز است، اما دوز بالا موجب عوارض جانبی بر روی بیماران APL می‌شود(۹). به منظور کاهش دوز آرسنیک تری‌اکساید و دسترسی به افزایش اثرات شیمی‌درمانی، روش‌های درمانی به صورت استفاده ترکیبی از داروهایی که مکانیسم مشابه‌ای برای جلوگیری از تکثیر و یا از بین بردن سلول‌های سرطانی دارند؛ باید طراحی شوند، که از یک طرف موجب افزایش تاثیر درمان و از طرف دیگر موجب کاهش اثرات ناخواسته گردند(۱۱، ۱۰). تالیدومایـد دارای خواص ایمونومدولاتوری، ضد التهابی و آنتی‌آنژیوژنیک می‌باشد. تالیدومایـد در سال۱۹۵۶ اولین بار در آلمان تولید شد و به عنوان داروی بی‌خوابی و رفع تهوع صبحگاهی در خانم‌های باردار به مصرف رسید ولی به دنبال داشتن عوارض تراتوژنیک مصرف آن متوقف گردید. با وجود عوارض جدی که متاسفانه این دارو ایجاد می‌کند، تحقیق در زمینه تاثیرات بالقوه این دارو جذابیت خاصی برای دانشمندان دارد و مشخص گردید که این دارو یک داروی بسیار مناسب بر علیه التهاب و سرطان است(۱۲، ۱۰). این دارو با اثر سرکوب‌کنندگی بر مرحله مهم تشکیل رگ یعنی خاموشی بیان اینتگرین به علت اثر سرکوب‌کنندگی بر TNF-α , INF-γ ایفای نقش می‌کند. دو رده سلولی KG-1 و U937 به عنوان دو مدل حساس و مقاوم به داروهای رایج در درمان AML در این مطالعه استفاده شدند. رده سلولی KG-1 از بیماری ۵۹ ساله با لوسمی میلوژنی M0 استخراج شده است. سلول KG-1 به عنوان مدل LSCs (Leukemia Stem Cell) در مطالعه‌های تحقیقاتی استفاده می‌شود و دارای شباهت مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی با سلول‌های میلوئید بالغ و نابالغ DC (Dendritic cell) می‌باشد. این سلول‌ها دارای مارکرهای متعدد توموری بوده و در مطالعه‌های تومورژنیسیتی و تمایز مورد استفاده قرار می‌گیرند. رده سلولی U937 نمونه AML بیمار ۳۷ ساله با لوسمی میلوژنی M5 می‌باشد که بسیاری از خصوصیات مونوسیت را به نمایش می‌گذارد و مورد استفاده مطالعه‌های رفتاری و تمایزی مونوسیت‌ها و نیز به عنوان مدلی برای نشان دادن تمایز ماکروفاژ/ مونوسیت، آزمایش‌های ضد توموری و تومورژنیسیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور معمول درمان(7+3) AML شامل ترکیبی ازcytarabine و یک anthracycline از قبیل daunorubicin (DNR) یا anthracenedione (mitoxantrone) است که در مطالعه‌های تحقیقاتی آزمایشگاهی استفاده می‌شوند(۱۳). از مجموع آن چه گفته شد برآن شدیم که برای اولین بار به ارزیابی اثر ترکیبی دو داروی آرسنیک تری‌اکساید وتالیدومایـد به عنوان یک ترکیب جدید با خاصیت ضد سرطانی منحصر به فرد بر روی بیان ژن *VEGF A* و بررسی آپوپتوز در محیط آزمایشگاهی بر روی سل لاین‌های مقاوم و حساس

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

به داروهای متداول شیمی‌درمانی AML بپردازیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

مطالعه انجام شده از نوع تجربـی بـود. دو رده سـلولی KG-1 و U937 در محیط RPMI1640 با ۱۰٪ سرم گـاوی (Fetal Bovin Serum) بـرای U937 و ۲۰٪ سـرم گـاوی برای KG-1 ، همراه بـا ۱۰۰ U/mL پنـی‌سـیلین و µg/mL ۱۰۰ استرپتومایسین کشت و نگهداری می‌شود. سـلول‌هـا در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبـت و ۵٪ دی‌اکسید کربن، انکوبه خواهند شد.

Microculture Tetrazolium Test (MTT):

برای اندازه‌گیری اثـر مهـاری تالیدومایـد(سـانتاکروز) و آرسنیک تری اکساید(سینا دارو) برروی فعالیت متابولیکی سـلول‌هـای U937 و KG-1 بـه روش MTT Assay [بـرای ساخت محلول MTT ، ۵ میلـی گـرم پـودر MTT را در ۱ میلی‌لیتر محیط RPMI 1640 بدون FBS حـل کـرده (ایـن پودر به سختی حل می‌شود) تا محلـول ۵ mg/mL سـاخته شود. سپس با محیط RPMI آن را به حجـم ۱۰ میلـی‌لیتـر رسانده تا استوک ۰/۵ mg/mL ساخته شود(این محلول بـه صورت تازه استفاده می‌شـود)]. در ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ سـاعت از پـودرMTT (مشـتق از نمـک‌هـای تیـازول) و محلـول DMSO (دی‌متیـل سولفواکسـاید) اسـتفاده خواهـد شـد. محلول MTT (۰/۵ mg/mL) بـه مقـدار ۵۰ میکرولیتـر بـه سلول‌ها اضافه می‌شود و سلول‌ها به مـدت چهـار سـاعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه خواهند شد تا این محلـول را متابولیزه کنند. رسـوب فرمـازان تشـکیل شـده بـا ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل خواهد شد و محلول بنفش رنگـی ایجاد می‌شود. این مراحل باید به سرعت انجام گیـرد(بین ۱ تا ۲ دقیقه بعد از ریختن محلول DMSO ، سلول‌ها باید در دستگاه ELISA Reader قرار بگیرنـد) زیـرا DMSO در صورت تماس طولانی مدت با سلول‌ها برای آن‌هـا سـمی است و سپس جذب نوری با دستگاه الایزا ریدر در طـول مـوج ۵۷۸ نـانومتر خوانـده خواهـد شـد. سـلول‌هـا بـا غلظـت‌هـای µmol ۱۰۰–۵ تالیدومایـد و µmol ۵–۰/۴ آرسنیک به مدت ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار می‌شوند.

سنجش میزان آپوپتوزسلولی به روش فلوسیتومتری:

بـدین منظـور ۲۴ و ۴۸ سـاعت پـس ازتیمـار نمـودن رده‌هـای سـلولی KG-1 و U937 توسـط آرسـنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد و نیز ترکیب آرسنیک تری‌اکساید با تالیدومایـد که در پلیت‌هـای ۲۴ خانـه کشـت داده شـده بودنـد، بـا اسـتفاده از کیـت رنگـی دوگانـه Annexin/PI سلول‌ها جهت بررسی میزان آپوپتوز رنگ‌آمیزی شـدند.در این روش سلول‌هـای تیمـار شـده بـا بـافر شسـته شـد و سوسپانسـیون سـلولی تهیـه گردیـد(۱×۱۰^۶ در هـر میلی‌لیتر). ابتدا سلول‌ها جمع‌آوری شده و بـا دور G ۶۰۰ در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سـلول‌هـا ۱ بار توسط PBS 1X شسته شدند. به هر لوله ۱۰۰ میکرو لیتر از Binding buffer 1X که به آن ۱ میکرولیتر از رنـگ آنکسین بـا غلظـت اسـتوک ۰/۵ mg/mL و ۱µL از PI بـا غلظت اسـتوک ۰/۱ mg/mL اضـافه شـده بـود، افـزوده و لوله‌ها به آرامی ورتکس شدند. لوله‌هـا بـه مـدت ۱۵–۱۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند و سـپس بلافاصله توسط فلوسیتومتری آنالیز شدند. نتـایج دسـتگاه فلوسیتومتری توسط نرم‌افزار FlowJO بـا version (7.6.1) تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: توالی آغازگرهای جلوبرنده و معکوس

ژن	آغازگر رفت(5′-3′)	آغازگر برگشت(5′-3′)	اندازه (bp)	منابع
HPRT	GCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTG	AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTG	۲۶	(۱۳)
VEGF-A	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA	۲۱	(۱۴)

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

استخراج RNA ، ساخت cDNA و بررسی بیان ژن توسط Real Time quantitative PCR :

برای استخراج RNA سلول‌ها TriPure (رُوش) مورد استفاده قرار گرفت.

برای اندازه گیری غلظت RNA نمونه‌ها از دستگاه نانو دراپ(آلمان، NanoDrop) استفاده گردید. با استفاده از کیت cDNA سنتاز (Takara Bio) از RNAها ، cDNA ساخته شد و تغییرات در سطح mRNA به روش Real-time PCR انجام شد. روش Real-time PCR با دستگاه light cycler instrument (دیاگنوستیک، رُوش، آلمان) انجام شد. برای انجام PCR برای هر نمونه مقدار ۱۰ میکرو لیتر SYBR Green master mix ، ۲ میکرولیتر cDNA ، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس و۱ میکرولیتر آغازگر جلوبرنده(۱۰ پیکومول) و ۶ میکرولیتر آب با هم ادغام گردید(جدول ۱).

برنامه دمایی PCR برای مرحله فعال‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و برای مرحله آنیلینگ/اکستنشن در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت۲۰ ثانیه و تعداد چرخه‌های دمایی ۴۰ بار خواهد بود.

به منظور تکثیر هر قطعه‌ی ژنی، یک جفت آغازگر اختصاصی برای هر ژن انتخاب شد که شامل آغازگر جلوبرنده و معکوس بود. اختصاصیت تمامی آغازگرها با نرم‌افزار آنلاین Primer-BLAST (وب سایتNCBI) تأیید شده است.

یافته‌ها

بررسی‌های MTT در رده سلولی KG-1 :

نتایج حاکی از آن است که در رده سلولی KG-1 اثر آرسنیک تری‌اکساید در دوزهای ۱/۶۱۸ (اگر چه مقدار دوز آرسنیک تری‌اکساید در رده سلولی KG-1 یک مقدار عددی می‌باشد و یک نسبت نیست؛ با این وجود این دوز نتایج مؤثرتری نسبت به دوزهای بالا و پایین‌تر خود نشان داده است. اخیراً استفاده از این نسبت در پروژه‌های مربوط بهDrug discovery بررسی شده است) تا ۵ میکرومولار و اثر تالیدوماید در دوزهای ۶۰ تا ۱۰۰ میکرومول قابل توجه بوده است(نمودار ۱)(۱۴). هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو نشان می‌دهد ۱/۶۱۸ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید و ۸۰ میکرومولار تالیدوماید می‌توانند کشندگی بیشتری به دنبال داشته باشند(نمودار ۱).

بررسی‌های MTT در رده سلولی U937 :

نتایج حاکی از آن است که در رده سلولی U937 اثر آرسنیک تری‌اکساید در دوزهای ۱ تا ۵ میکرومولار و اثر تالیدوماید در دوزهای ۶۰ تا ۱۰۰ میکرومولار قابل توجه بوده است(نمودار ۲). هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو نشان می‌دهد ۱ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید و۶۰ میکرومولار تالیدوماید می‌توانند کشندگی بیشتری به دنبال داشته باشند(نمودار ۲).

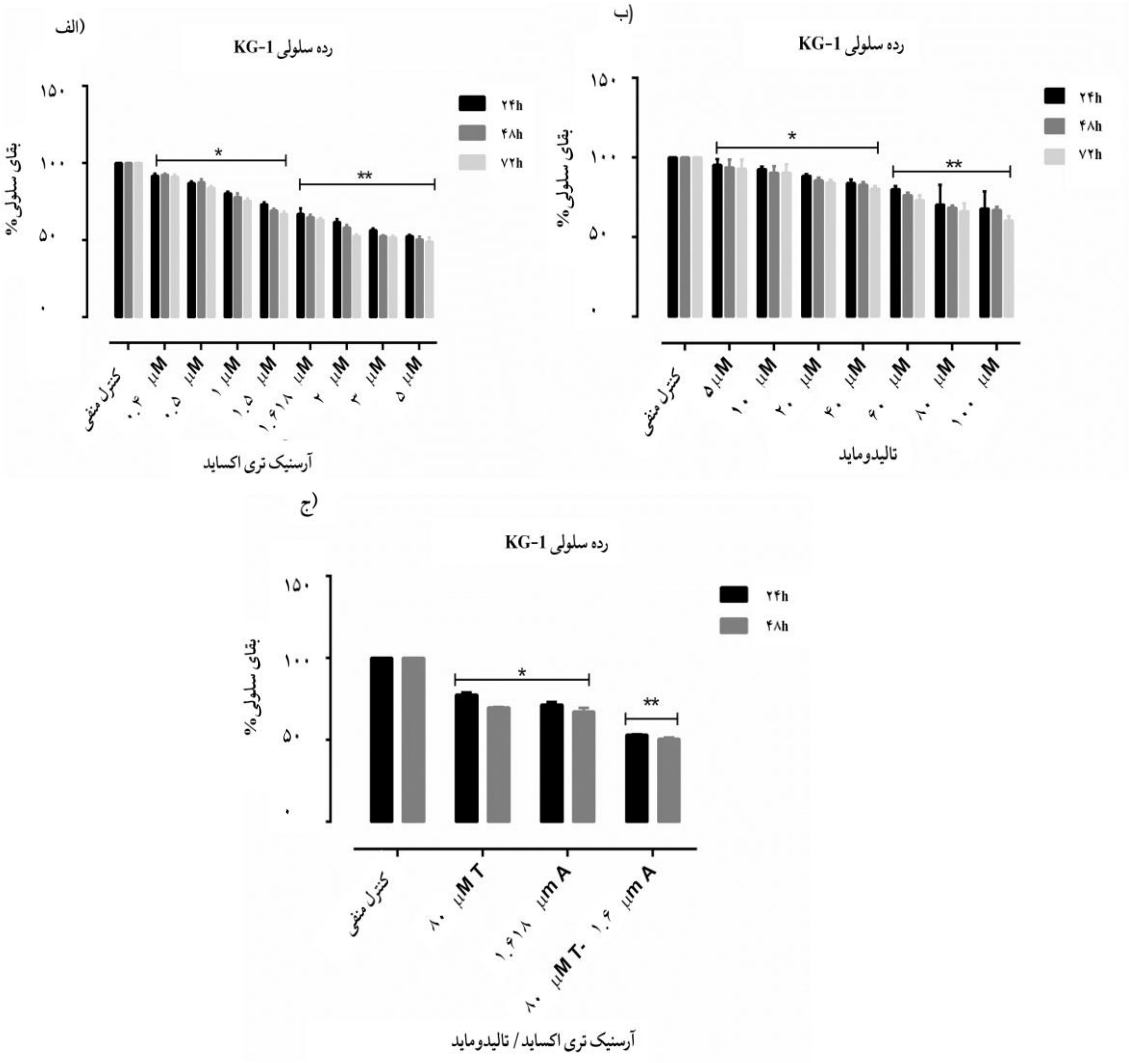
همان طور که نتایج نمودارهای فوق نشان می‌دهد درصد بقای سلول‌های تیمار شده با آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید در یک روند وابسته به دوز و زمان نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد.

در ادامه جهت تایید نتایج بقا حاصل از آزمایش MTT، به منظور ارزیابی اثر القایی آرسنیک تری‌اکساید به تنهایی یا در ترکیب با تالیدوماید بر فعالیت کشندگی و مهار رشد سلولی و مشخص شدن این که این اثر با واسطه آپوپتوز و یا با واسطه نکروز سلولی است، رنگ‌آمیزی Annexin/PI انجام شد و درصد سلول‌های آپوپتوتیک تعیین گردید. نتایج Annexin/PI مؤید این مسئله است که آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید دارای اثرات کشندگی در هر دو رده سلولی در یک روند وابسته به دوز است.

بررسی‌ها به منظور تعیین اثرات تیمار هم زمان ترکیبی آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید بر بقا و رشد دو رده سلولی KG-1 و U937 در یک بازه زمانی ۴۸ ساعتی صورت گرفت.

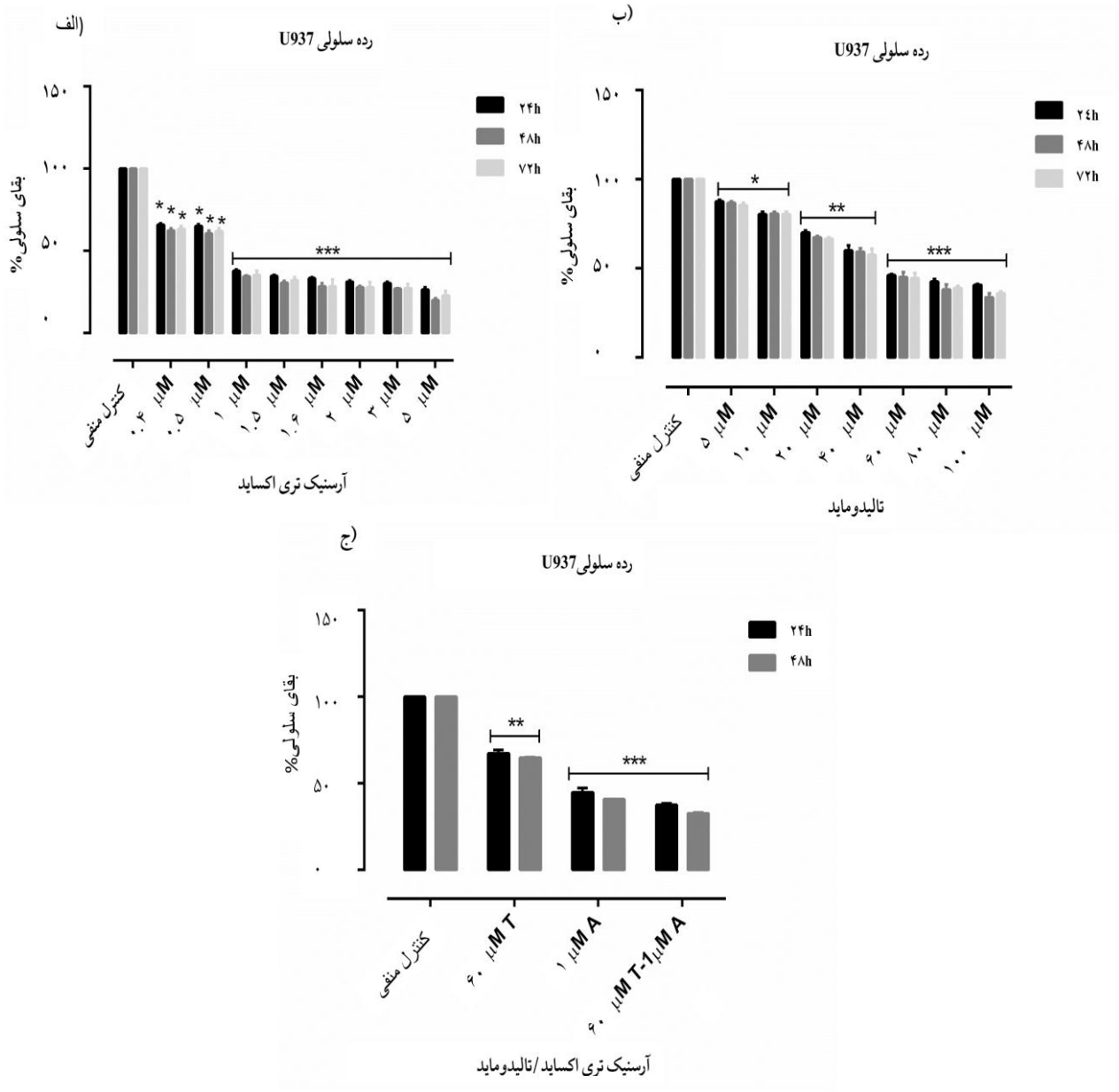
در این آزمایش تنها جمعیت‌هایی که $Annexin^+$ و یا $Annexin^+/PI^+$ باشند حائز اهمیت بوده و جمعیت‌های PI^+ به تنهایی حاکی از نکروز سلولی بوده که فاقد اهمیت می‌باشند(شکل‌های ۱ و ۲).

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019



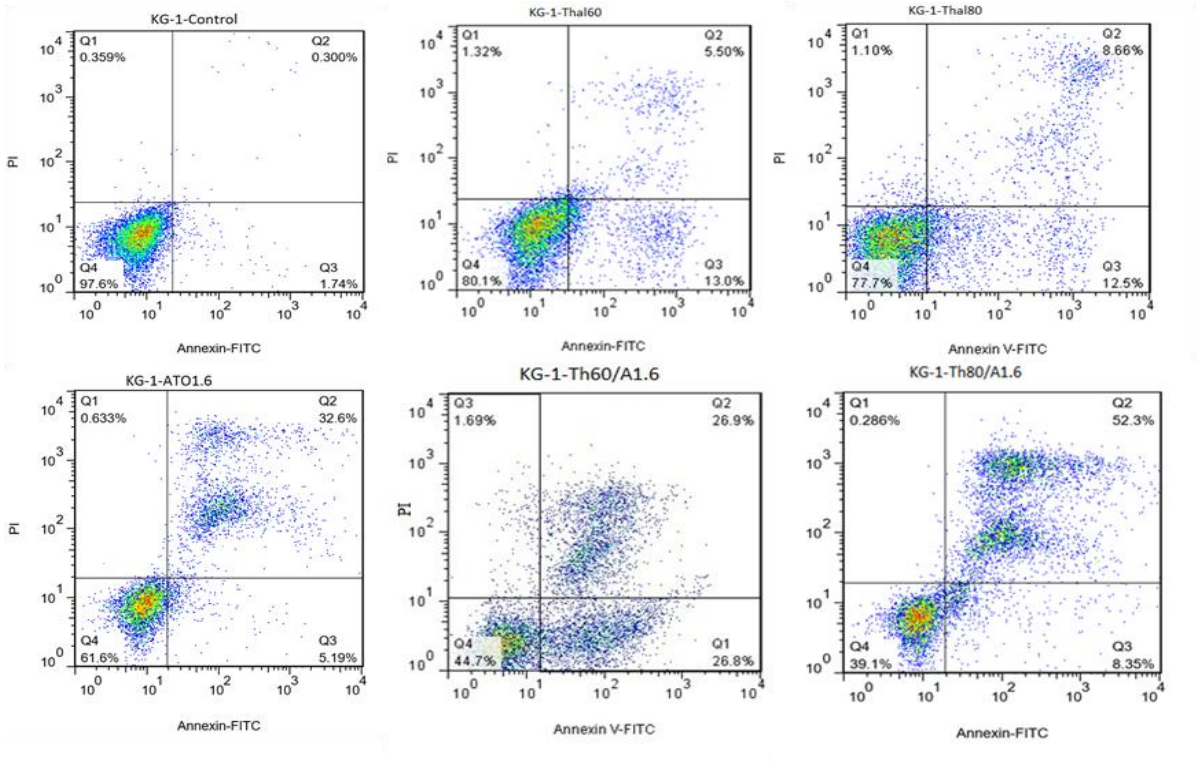
نمودار ۱ : A) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(μM ۵-۰/۴) آرسنیک تری‌اکساید بر رشد سلول‌ها و بقا. B : نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(μM ۱۰۰ -۵) تالیدومایید بر رشد سلول‌ها و بقا. C : نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید و هم‌چنین اثر ترکیبی آن‌ها بر رشد سلول‌ها و بقا. رده سلولی KG-1 در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT . با سه بار تکرار به صورت SD±mean نمایش داده شده و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت ۰/۰۵ >p * و ۰/۰۱ >p ** تعریف شده است.

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

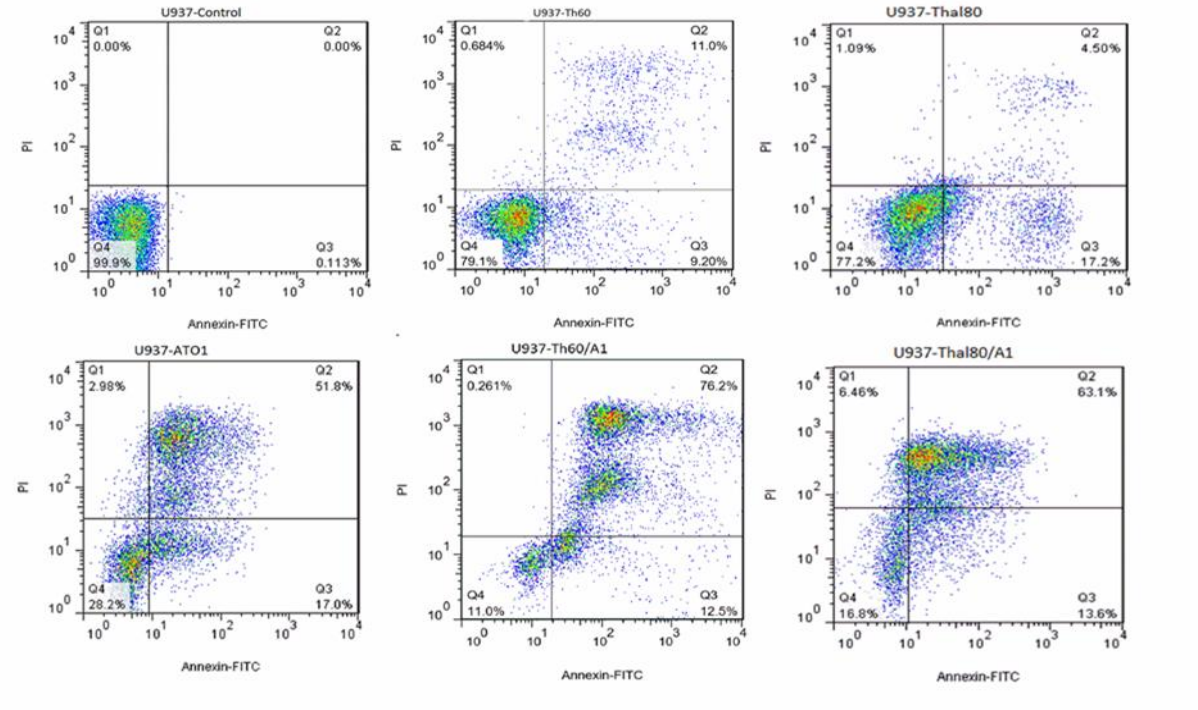


نمودار ۲ : A) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(۰/۵-۴ μM) آرسنیک تری‌اکساید بر رشد سلول‌ها و بقا. B) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(۵ -۱۰۰ μM) تالیدومایید بر رشد سلول‌ها و بقا. C) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید و هم چنین اثر ترکیبی آن‌ها بر رشد سلول‌ها و بقا. رده سلولی U937 در بازه زمانی۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT . با سه بار تکرار به صورت mean ± SD نمایش داده شده و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت p< ۰/۰۵ *، p< ۰/۰۱ ** و p< ۰/۰۰۱ * تعریف شده است.**

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

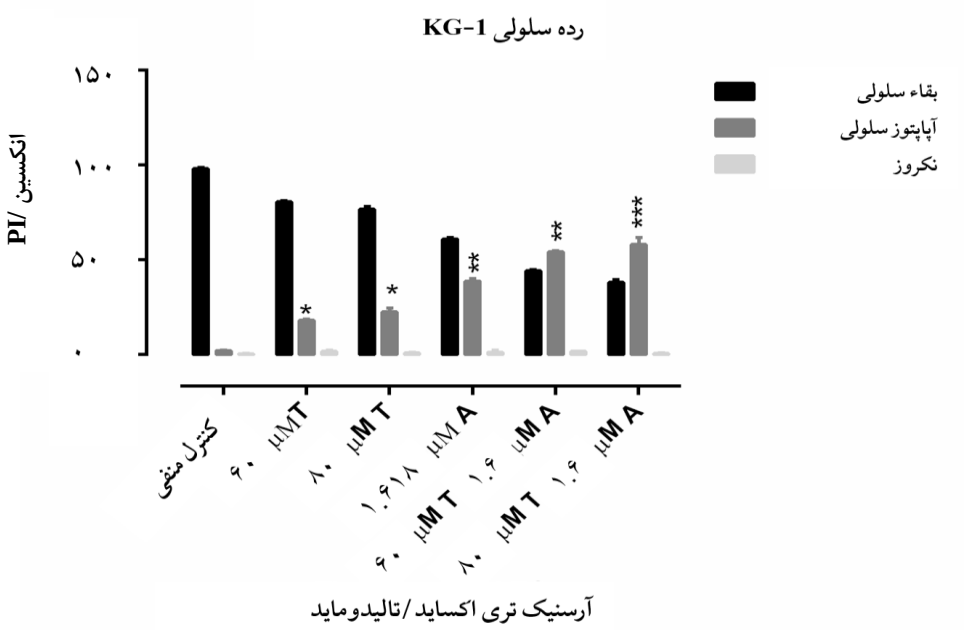


شکل ۱: بررسی آپوپتوز با داروهای آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید بر روی KG-1

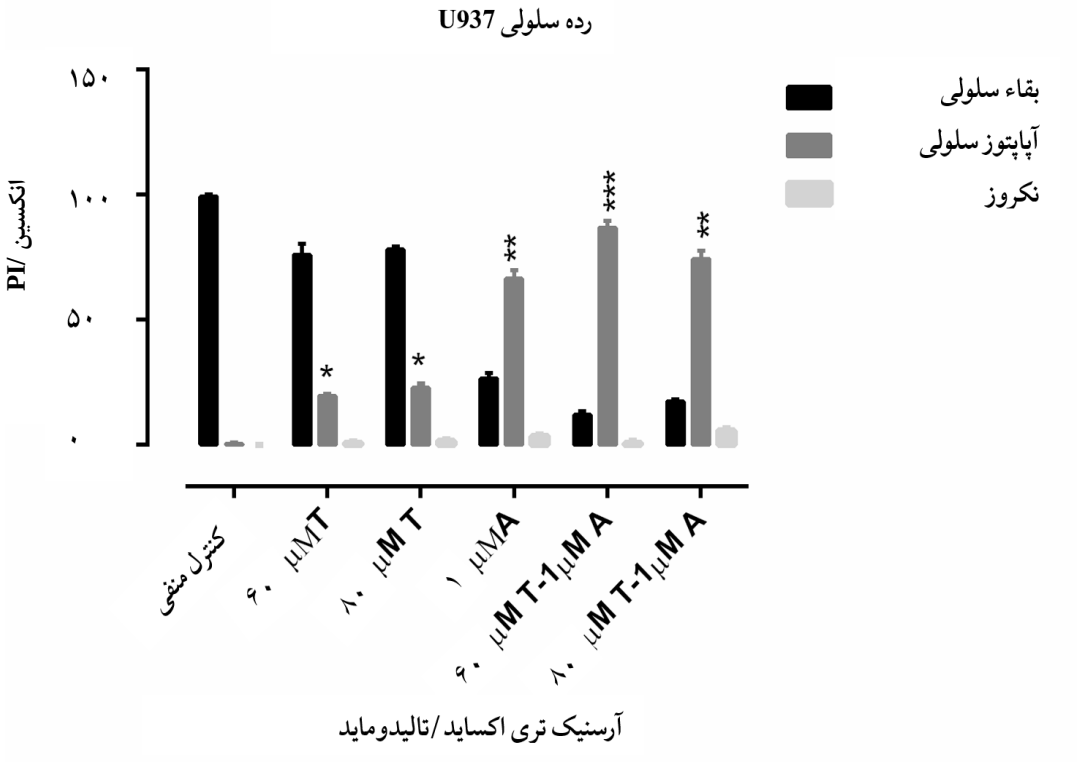


شکل ۲: بررسی آپوپتوز با داروهای آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید بر روی U937

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

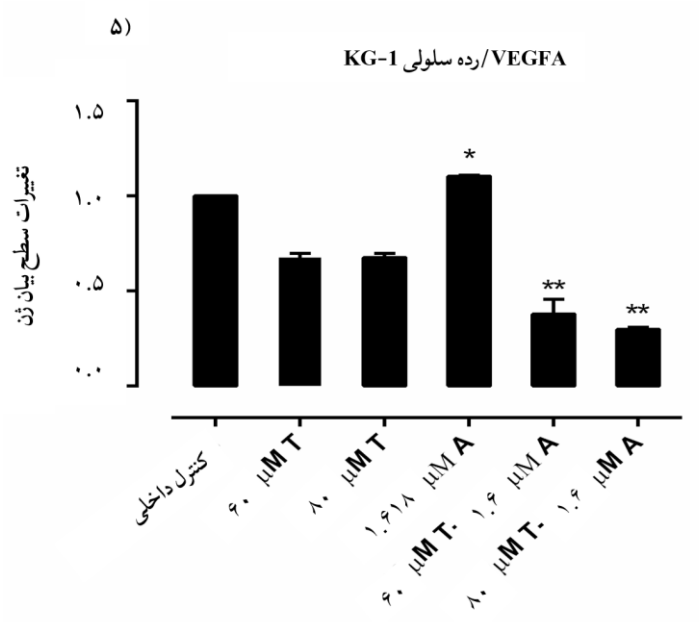


نمودار ۳ : نتایج بررسی آپوپتوز سلولی حاصل از رنگ آمیزی **Annexin/PI** در رده سلولی **KG-1** در بازه زمانی ۴۸ ساعت به دنبال تیمارسازی با غلظت‌های(۱/۶۱۸μM) آرسنیک تری‌اکساید و غلظت(μM ۶۰ و ۸۰) تالیدومايد و مقادیر ترکیبی آن‌ها را نشان می‌دهد.

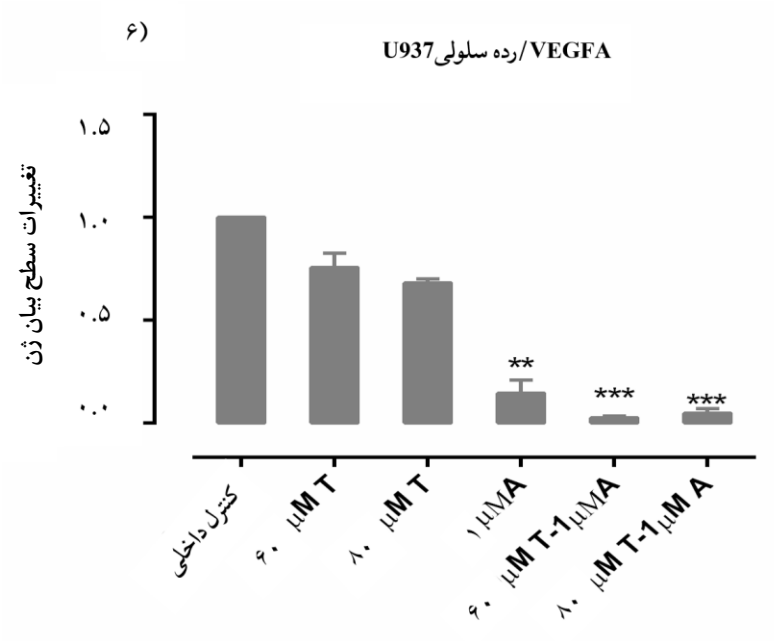


نمودار ۴: نتایج بررسی آپوپتوز سلولی حاصل از رنگ‌آمیزی **Annexin/PI** در رده سلولی **U937** در بازه زمانی ۴۸ ساعت به دنبال تیمارسازی با غلظت‌های (μM ۱) آرسنیک تری‌اکساید و غلظت(μM ۶۰ و ۸۰) تالیدومايد و مقادیر ترکیبی آن‌ها را نشان می‌دهد.

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019



نمودار ۵: نتایج تیمار سلول‌ها با آرسنیک تری‌اکساید(۱/۶۱۸ μM) و تالیدومایید(۶۰ μM و۸۰) و ترکیب آرسنیک و تالیدومایید بر روی بیان VEGF A. در یک بازه زمانی ۴۸ ساعتی. نمونه‌ها با سه بار تکرار به صورت mean ± SD نمایش داده شده‌اند و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت ۰/۰۵ >p * ، ۰/۰۱ >p ** و ۰/۰۰۱ >p * تعریف شده است.**



نمودار ۶ : نتایج تیمار سلول‌ها با آرسنیک تری‌اکساید(۱μM) و تالیدومایید (۶۰μM و۸۰) و ترکیب آرسنیک و تالیدومایید بر روی بیان VEGF A. در یک بازه زمانی ۴۸ ساعته. نمونه‌ها با سه بار تکرار به صورت mean ± SD نمایش داده شده‌اند و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت ۰/۰۵ >p * ، ۰/۰۱ >p و ۰/۰۰۱ >p *** تعریف شده است.**

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

نتایج بررسی Annexin/PI در رده سلولی KG-1 و U937:

نتایج نشان داد که سلول‌های KG-1 و U937 تیمار شده با دوزهای ترکیبی آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد، یک افزایش آپوپتوتیک قابل توجهی را نسبت به دوزهـای آرسـنیک تـری اکسـاید و تالیدومایـد بـه تنهـایی، نشـان می‌دهد(نمودارهای ۳ و ۴).

نتایج بررسی اثر آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد بر روی بیـان ژن VEGF A در سطـح mRNA در رده‌ی سـلولی KG-1:

نتایج بررسی میـزان بیـان ژن *VEGF A* در رده سـلولی KG-1 نشـان مـی‌دهـد میـزان بیـان در دوزهـای ۶۰ و ۸۰ میکرومولار تالیدومایـد کاهشی و در دوز ۱/۶۱۸ آرسـنیک تری‌اکساید افزایشی بوده و هم چنین اثـر ترکیبـی ایـن دو دارو میزان بیان را به نسبت کنترل کـاهش مـی‌دهـد، ایـن کاهش بیـان در دوز ۸۰ میکرومـولار تالیدومایـد و ۱/۶۱۸ آرسنیـک تـری‌اکساید بیشتر نشان داده شده است (نمودار ۵).

نتایج بررسی اثر آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد بر روی بیان ژن VEGF A در سطح mRNA در رده‌ی سلولی U937:

نتایج بررسی میـزان بیـان ژن *VEGF A* در رده سـلولی U937 نشـان مـی‌دهـد میـزان بیـان در دوزهـای ۶۰ و ۸۰ میکرومـولار تالیدومایـد کاهشـی بـوده و در دوز ۱ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید نیز کاهشـی بـوده و هـم چنین اثر ترکیبی این دو دارو میزان بیان را به نسبت کنترل کاهش می‌دهد، این کـاهش بیـان در دوز ۶۰ میکرومـولار تالیدومایـد و ۱ آرسنیک تری اکساید بیشتر نشان داده شده است(نمودار ۶).

بحث

لوسمی میلوئیدی حاد یکـی از شـایع‌تـرین اخـتلالات هماتولوژیک است. اگر چـه بـیش از ۸۰ درصـد بیمـاران مبـتلا بـه AML بـا داروهـای رایـج امـروزی بـه مرحلـه خاموشی کامل می‌رسند، ولی میزان بقای ۵ ساله تنها بـین ۴۰ –۵۰ درصد می‌باشـد و شـانس بقـای طـولانی مـدت بسیار پائین است، که این خـود حـاکی از ناکارآمـد بـودن درمان‌های رایج می‌باشد(۱۵). داروها بـا اسـاس آرسـنیک بـه عنـوان عوامـل شـیمی‌درمـانی مـؤثر بـرای درمـان بیماری‌های مختلـف و برخـی از تومورهـا اسـتفاده شـده است(۱۴). در مطالعه‌ها نشان داده شـده کـه ایـن ترکیـب سبب توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز درسـلول‌هـای APL و non-APL می‌شود. بنابراین تصـمیم گـرفتیم بـرای اولین بار بـه ارزیـابی اثـر ترکیبـی تالیدومایـد و آرسـنیک تری‌اکساید بر روی بیـان ژن *VEGF A* در سـل‌لایـن‌هـای U937 و KG-1 بپردازیم.

در این مطالعه ارزیابی اولیـه توسـط MTT بـه منظـور تعیین اثرات توکسیک آرسنیک تری‌اکسـاید و تالیدومایـد در بازه زمانی مختلف در دو رده‌ی سلولی KG-1 و U937 صورت گرفت. دوز انتخابی توسـط ایـن آزمـایش ۱/۶۱۸ میکرومولار برای آرسنیک تری‌اکسـاید و ۶۰ و ۸۰ میکـرو مولار بـرای تالیدومایـد و هم چنیـن دوز ترکیبی(۸۰μMT-۱/۶۱۸μMA) برای رده‌ی سـلولی KG-1 در نظـر گرفتـه شد. هم چنین دوزهـای انتخـابی توسـط آزمـایش ۱ μM برای آرسنیک تری‌اکساید و ۶۰ μM و ۸۰ برای تالیدومایـد در رده سلولی U937 در نظر گرفتـه شـد. هـم چنـین دوز ترکیبی(۱ μM A -۶۰μM T) برای رده‌ی سلولی U937 در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان آپوپتوز و نکروز توسـط این دوزها، آزمایش فلوسایتومتری انجام شد. نتایج حـاکی از آن بود که ایـن دوزهـای آرسـنیک و تالیدومایـد و اثـر ترکیبی آن‌ها قادر به القای درصد قابل تـوجهی از آپوپتـوز می‌باشد. علاوه بر آن کـه مطالعـه‌هـای گذشـته بیـانگر آن هسـتند کـه دوز اسـتاندارد بـرای القـای آپوپتـوز توسـط آرسنیک تری‌اکسـاید در محـدوده غلظتـی ۲–۰/۵ میکـرو مولار است. بنابراین دوزهای اصلی برای این مطالعه برای آرسنیک ۱/۶۱۸ میکرومولار و ۱ میکرومولار به ترتیـب در رده سلولی KG-1 و U937 انتخاب شـد. بـر اسـاس نتـایج حاضر، آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد در مهار رشـد و القای آپوپتوز در رده سـلولی KG-1 و U937 بـه صـورت وابسته به دوز و زمان عمل کرده است.

در مطالعه‌ها مشخص شده است که VEGF (VEGF A) فاکتور رشد اختصاصی بـرای آنژیـوژنز مـی‌باشـد. VEGF

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

ترشح شده توسط سلول لوسمی با گیرنده‌های مربوطـه در سطح سلول‌های اندوتلیال در ارتباط اسـت و سـلول‌هـای اندوتلیال را بـرای تولیـد فاکتورهـای رشـد کـه بـر روی سلول‌های لوسمیک قرار دارند؛ تحریک می‌کند در نتیجـه فعالیت تکثیری و مقاومت دارویی افـزایش مـی‌یابـد(۱۶). بنـابراین درمـان ضـد آنژیـوژنز بـر اسـاس مهـار فعالیـت فیزیولوژیکی VEGF یک اسـتراتژی جدیـد بـرای درمـان هدفمند است. در مطالعه‌های اخیر بیـان VEGF و VEGF-R در بیماران AML مشاهده شده است.

آرسـنیک تـری‌اکسـاید بـه عنـوان یـک داروی چنـد هـدفی(Multi target) شـناخته شـده اسـت. آرسـنیک تری‌اکساید قادر به فعال کردن JNKs می‌باشد. JNKs یـک پروتئین کیناز فعال شده میتوژنی است که بـا فعـال کـردن ROS و به دنبال آن فعال شـدن Cyt P450 و P38 MAPK منجر به القای آپوپتوز و هم چنین باعث مهار مسیر PI3K-Akt-mTOR شده و از سوی دیگـر، JNKs سـبب افـزایش بیان PTEN که یک سرکوبگر تومور اسـت؛ مـی‌شـود کـه منجر به مهار PI3K-Akt-mTOR خواهد شد. از آن جـایی که مسـیر PI3K-Akt-mTOR مسـیر حفـظ حیـات سـلول شناخته می‌شود؛ مهار این مسیر می‌تواند مـرگ سـلولی را افزایش دهد. هم چنین در مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند که آرسنیک تری‌اکساید باعث فعال شـدن سـیتوکروم C و فعال شدن مسیر آبشـاری کاسـپازها و درنهایـت آپوپتـوز می‌شود(۱۷).

تالیدومایـد بـا اثـر بـر روی ژن‌هـای مسـیر رگ‌زایـی می‌تواند از توسعه سرطان پیشگیری کنـد. تالیدومایـد اثـر مهاری خود را بر روی رگ‌زایـی توسـط مهـار β-FGF در rabbit cornea و توسـط مهـار VEGF در murine model نشان داد(۱۹، ۱۸).

تالیدومایـد به علت ویژگـی ضـد رگ‌زایـی خـود روی چندین نوع از تومورها تحت ارزیابی قـرار گرفتـه اسـت، مثل بدخیمی‌های هماتولوژیک، میلوم مالتیپل و تومورهای جامد. در این مطالعه‌ها نشان داده شده است که تالیدومایـد موجب کاهش بیان عوامل مؤثر در رگ‌زایی می‌شـود(۲۴-۲۰).

استینز و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مطالعه خود نتـایج مشابهی را گزارش کردند کـه تالیدومایـد بـا پـایین آوردن سطح FGF-2 و VEGF باعث آنتی آنژیوژنز می‌شوند(۲۵).

روبوز در سال ۲۰۰۰ نشان داد که آرسنیک تری‌اکساید با مهار VEGF منجر به القای آپوپتوز در لوسمی می‌شـود. هم چنین آن‌ها نشان دادند کـه ایـن دارو PML/RAR-α را تخریب می‌کند(۱۸).

چـن و همکـارانش بـا بررسـی‌هـایی بـر روی NB4 و آرسنیک تری‌اکساید افزایش آپوپتوز را بـه واسـطه کنتـرل کردن bcl-2 و PML/RAR-α نشان دادند(۲۶).

یانگ و همکارانش در مطالعه‌ای بر روی سـرطان ریـه در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که آرسنیک تری‌اکساید با مهـار فاکتورهـــایی از قبیـــل VEGF-A، VEGFR-2، HIF-1α و Notch-1 مسیر آنژیوژنز را مهار می‌کند(۲۷).

نتیجه‌گیری

اثر ترکیبی این دارو سـبب افـزایش آپوپتـوز سـلولی و کـاهش میـزان بیـان ژن اصـلی در رگزایـی *(VEGF A)* می‌شود. با توجه به نتایج حاصـل از ایـن مطالعـه و نتـایج مطالعـه‌هـای گذشـته ایـن دو دارو بـه صـورت ترکیبـی می‌توانند اثرات مؤثری در درمان سرطان خون ایفا کنند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات هماتولوژی، آنکولـوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شـریعتی به خاطر تـامین بودجـه طـرح قـدردانی می‌گردد.

References:

1- Coldman A, Goldie J. A stochastic model for the origin and treatment of tumors containing drug-resistant cells. Bull Math Biol 1986; 48(3-4): 279-92.
2- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, *et al*. A cell initiating humanacute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 1994; 367(6464): 645.
3- Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. Eur Cytokine Netw 2005; 16(1): 41-6.
4- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

Ther 2004; 103(2): 147-66.
5- Hayashibara T, Yamada Y, Miyanishi T, Mori H, Joh T, Maeda T, *et al*. Vascular endothelial growth factor and cellular chemotaxis: a possible autocrine pathway in adult T-cell leukemia cell invasion. Clin Cancer Res 2001; 7(9): 2719-26.
6- Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cell Signal 2007; 19(10): 2003-12.
7- Hu X, Mendoza FJ, Sun J, Banerji V, Johnston JB, Gibson SB. Lysophosphatidic acid (LPA) induces the expression of VEGF leading to protection against apoptosis in B-cell derived malignancies. Cell Signal 2008; 20(6): 1198-208.
8- Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Research 2002; 62(14): 3893-903.
9- Mandegary A, Hosseini R, Ghaffari S, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghavamzadeh A, *et al*. The expression of p38, ERK1 and Bax proteins has increased during the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. Ann Oncol 2010; 21(9): 1884-90.
10- Mohammadi Kian M, Mohammadi S, Tavallaei M, Chahardouli B, Rostami S, Zahedpanah M, *et al*. Inhibitory Effects of Arsenic Trioxide and Thalidomide on Angiogenesis and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Leukemia Cells. Asian Pac J Cancer Prev 2018; 19(4): 1127-1134.
11- Haghi A, Mohammadi S, Heshmati M, Ghavamzadeh A, Nikbakht M. Anti-vascular endothelial growth factor effects of sorafenib and arsenic trioxide in acute myeloid leukemia cell lines. Asian Pac J Cancer Prev 2017; 18(6): 1655-61.
12- Salemi M, Ghavamzadeh A, Nikbakht M. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Targeting by Curcumin and Thalidomide in Acute Myeloid Leukemia Cells. Asian Pac J Cancer Prev 2017; 18(11): 3055-61.
13- Rao J, Xu D-R, Zheng F-M, Long Z-J, Huang S-S, Wu X, *et al*. Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. J Transl Med 2011; 9(1): 71.
14- Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2015; 373(12): 1136-52.
15- Gusenbauer S, Zanucco E, Knyazev P, Ullrich A. Erk2 but not Erk1 regulates crosstalk between Met and EGFR in squamous cell carcinoma cell lines. Mol Cancer 2015; 14(1): 54.
16- Carter-Cooper B, Sadowska M, Wonodi O, Lapidus RG, Levis M, Sausville EA. Synergistic Antileukemic Effect Of Sequential Administration Of Dichloroacetate (DCA) Combined With Arsenic Trioxide (ATO) In Primary Blasts From Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML) and FLT3-ITD AML Cell Lines. Blood 2013; 122: 3955.
17- Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 1995; 55(23): 5687-92.
18- Roboz GJ, Dias S, Lam G, Lane WJ, Soignet SL, Warrell RP, *et al*. Arsenic trioxide induces dose-and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis. Blood 2000; 96(4): 1525-30.
19- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(9): 4082-5.
20- KENYON BM, Browne F, D'amato RJ. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. Exp Eye Res 1997; 64(6): 971-8.
21- Eisen T, Boshoff C, Vaughan M, Pyle L, Smith I, Johnston S, *et al*. Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ov arianand breast cancer. Br J Cancer 2000; 82(4): 812-7.
22- Dahut WL, Gulley JL, Arlen PM, Liu Y, Fedenko KM, Steinberg SM, *et al*. Randomized phase II trial of docetaxel plus thalidomide in androgen - independent prostate cancer. J Clin Oncol 2004; 22(13): 2532-9.
23- Long G, Vredenburgh J, Rizzieri D. Pilot trial of thalidomide post-autologous peripheral blood progenitor cell transplantation (PBPC) in patients with metastatic breast cancer. Proc Am Soc Clin Oncol; 1998.
24- Marx G, Levi J, Bell D, Boyle F, McCowatt S, Monk R, *et al*. A phase I/II trial of thalidomide as an antiangiogenic agent in the treatment of advanced cancer. Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol; 1999.
25- Steins M, Bieker R, Padro T, Kessler T, Kienast J, Berdel W, *et al*. Thalidomide for the treatment of acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2003; 44(9): 1489-93.
26- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni J, Zhong H, Si G, *et al*. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood 1996; 88(3): 1052-61.
27- Yang MH, Zang YS, Huang H, Chen K, Li B, Sun GY, *et al*. Arsenic trioxide exerts anti-lung cancer activity by inhibiting angiogenesis. Curr Cancer Drug Targets 2014; 14(6): 557-66.

Downloaded from bloodjournal.ir at 18:43 +0430 on Sunday September 15th 2019

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2019; 16(1): 44-56

Original Article

The impact of Arsenic trioxide and thalidomide on *VEGF A* gene expression in AML cell lines

Mohammadi Kian M.[1], Mohammadi S.[2], Tavallaie M.[1], Sadeghi M.[1], Nikbakht M.[2]

[1]Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Arsenic trioxide has anti-cancer effects on a wide range of cancers, mainly by inducing apoptosis in cancerous cells. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. The main purpose of this study was to investigate the combined effect of arsenic trioxide and thalidomide on the expression level of *VEGF A* gene.

Materials and Methods

In this experimental study, MTT test was used to investigate the effect of arsenic trioxide and thalidomide both in isolation as combined on cell viability of KG-1 and U937 cells at different times and different doses. Cell apoptosis was assessed by flow cytometry. The level of mRNA expression of *VEGF A* gene was assessed by Real Time PCR. Student-t, ANOVA and SPSS-17 software were used for data analysis.

Results

The selective doses of arsenic trioxide in the KG-1 and U937 cell lines were 1.618 μM and 1 μM, respectively. The selective doses of thalidomide in the KG-1 and U937 cell lines were 80 μM and 60 μM, respectively. Combination of arsenic trioxide and thalidomide had a significant effect on both cell lines. On the other hand, the expression of the *VEGF A* gene significantly decreased.

Conclusions

The present study showed that the expression of *VEGF A* gene in 1-KG and U937 cell lines decreased and the combination effect of arsenic trioxide and thalidomide on the cells induced apoptosis. To confirm these results further investigation is required on the protein level.

Key words: Arsenic, Thalidomide , Acute Myeloid Leukemia

Received: 30 Apr 2018
Accepted: 23 Sep 2018

Correspondence: Nikbakht M., PhD in Medical Biotechnology. Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital.
Postal Code: 1411713131, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902635; Fax: (+9821) 84902635
E-mail: *m-nikbakht@sina.tums.ac.ir*