

## اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز سلول‌های میلومی U266

زهرا عامری<sup>۱</sup>، سعیده غیاثی<sup>۱</sup>، علیرضا فارسی‌نژاد<sup>۲</sup>، محسن احسان<sup>۱</sup>، ساناز آقاجانی<sup>۱</sup>، نوشین پوریزداتپناه<sup>۱</sup>،  
شیمیا کاظم‌زاده<sup>۳</sup>، احمد فاطمی<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

تلومراز در اکثر سرطان‌های انسانی و میلوم مالتیپل بیان می‌شود و با توجه به عدم بیان آن در سلول‌های سوماتیک، هدف قرار دادن آن یک رویکرد درمانی مؤثر برای درمان سرطان می‌باشد. هدف از مطالعه، بررسی تاثیر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز سلول میلومی U266 بود.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های U266 با دوزهای مختلف MST-312 در زمان‌های مختلف تیمار شدند، سپس زنده مانی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو، فعالیت متابولیک سلول با روش رنگ سنجی MTT و آپوپتوز سلولی به روش فلوسایتومتری با استفاده از اتصال به آنکسین-7AAD/ V بررسی گردید. آپوپتوز در سطح ژن نیز با بررسی بیان ژن‌های BAX و BCL2 بعد از تیمار سلول‌ها با دارو و استخراج RNA با Real Time PCR انجام گرفت.

#### یافته‌ها

بیش از ۵۰٪ کاهش در زنده مانی سلول‌های تیمار شده در غلظت ۸ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد. فعالیت متابولیک سلول بعد از تیمار ۴۸ ساعته با دوزهای ۲، ۴ و ۸ میکرومولار MST-312 به ترتیب ۲۵٪، ۴۶٪ و ۶۲٪ کاهش یافت. تقریباً ۳۰٪ افزایش آپوپتوز در سلول‌های U266 بعد از مواجهه ۴۸ ساعته با ۲ میکرومولار MST-312 مشاهده شد. تیمار سلول‌های میلومی با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 به مدت ۴۸ ساعت، باعث افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان ژن BCL2 گردید.

#### نتیجه‌گیری

تیمار کوتاه مدت سلول‌های سرطانی میلومی با MST-312 باعث کاهش زنده مانی و فعالیت متابولیک و افزایش آپوپتوز سلولی می‌شود. این دارو با مهار تلومراز و القای آپوپتوز در سلول‌های میلومی می‌تواند به عنوان کاندیدی جهت درمان میلوم مالتیپل پیشنهاد شود.

**کلمات کلیدی:** آپوپتوز، میلوم مالتیپل، تلومراز

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۰

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۲- PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۳- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران - کد پستی: ۷۶۱۹۷۹۴۴۳۵

### مقدمه

میلوم مولتیپل (MM) دومین بدخیمی هماتولوژیک شایع و غیر قابل درمان پلاسماسل است که مغز استخوان را درگیر کرده و منجر به تکثیر بی‌رویه پلاسماسل‌های بدخیم (سلول‌های میلومی) تولیدکننده آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌گردد. این بدخیمی با آنمی، ضایعات استخوانی، هیپرکلسمی، و نارسایی کلیوی همراه می‌شود. MM یک سرطان منتشر است که تمام اسکلت را درگیر می‌کند. شایع‌ترین مشکل بیمار درد، نارسایی کلیوی و عفونت‌های مکرر است. البته علائم دیگری مثل آنمی، خستگی، تب، و عرق شبانه هم به طور شایعی در این بیماران دیده می‌شود. بیمار رنگ پریده است و بعضی از استخوان‌هایش بخصوص جناغ و لگن در لمس دردناک می‌باشد. شکستگی استخوان‌های ضعیف شده به خصوص در مهره، لگن و دنده در تعدادی از این بیماران دیده می‌شود (۱). در پاتوزن میلوم مولتیپل، IL6 نقش اساسی را ایفا می‌کند (۲).

سرطان‌ها با وجود داشتن ویژگی‌های هتروژن بسیار، در یکسری ویژگی‌ها مشترک هستند: توانایی تقسیم نامحدود، مقاومت به سیگنال‌های ضد رشد، فرار از آپوپتوز، آنژیوژنز، تهاجم و متاستاز. شاخص کلیدی انواع سلول‌های توموری، توانایی تقسیم نامحدود بوده که ارتباط تنگاتنگی با حفظ طول تلومر و افزایش بیان تلومراز دارد (۳).

تلومرها کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی با طول ۲۰Kb-۱۵ در انتهای کروموزم‌ها هستند (۴). تلومرازها آنزیم‌هایی هستند که با اضافه کردن تکرارهای TTAGGG به انتهای کروموزوم، باعث افزایش طول تلومر می‌شوند و در سلول‌های ژرم لاین و سلول‌های بنیادی و دیگر سلول‌هایی که تکثیر زیادی دارند بیان می‌شوند. هولوآنزیم تلومراز، نوکلئوپروتئینی متشکل از یک قسمت با فعالیت آنزیمی ترانس کریپتازی معکوس به نام hTERT و یک قسمت حاوی RNA به نام TERC که الگویی برای hTERT است، می‌باشد. در عدم حضور تلومراز، طول تلومر با هر تقسیم به قدری کاسته می‌شود که در نهایت رشد سلول متوقف شده و آپوپتوز رخ می‌دهد. تلومراز در طول تکامل و تمایز عمدتاً از طریق کنترل رونویسی hTERT تنظیم می‌شود (۵).

یافته‌ها حاکی از آن است که بیان نابه‌جای hTERT، مرحله بحرانی در شکل‌گیری بدخیمی است (۵، ۶). اگر به هر ترتیبی مکانیسم‌های کنترلی دچار اختلال شود، بیان نابه‌جای تلومراز منجر به حفظ طول تلومر، افزایش تکثیر، اختلال در مسیر سیکل سلولی و نهایتاً نامیرایی سلول‌ها می‌گردد (۷). فعالیت نابه‌جای تلومراز در بیش از ۸۵٪ از بدخیمی‌ها از جمله MM نشان داده شده است (۸، ۹). در سلول‌های سرطانی، بیان تلومراز توسط مسیر NF-κB، MYC و β-CATHENIN افزایش می‌یابد. هم‌چنین خود تلومراز نیز باعث افزایش فعالیت مسیر بیان ژن‌های یادشده، می‌شود (۱۰). مسیر NF-κB در سلول‌های MM فعال است و منجر به تولید سایتوکاین التهابی IL6 در این سلول‌ها می‌شود. این سایتوکاین در پاتوزن میلوم مولتیپل نقش اساسی را ایفا می‌کند (۲). طی تحقیقات به عمل آمده بر کلانژیوکارسینوم، نشان داده شده است که IL6 به عنوان یک سایتوکاین اتوکراین بر فعالیت تلومراز اثر گذاشته و با فعال کردن دوباره تلومراز، فرآیند Senescence را به تاخیر می‌اندازد، و منجر به بقای سلول‌های تومورال می‌گردد (۲). به نظر می‌رسد این سایتوکاین در سلول‌های میلومی نیز اثر مشابه داشته باشد. در واقع مسیر NF-κB با تولید IL6 باعث افزایش بیان تلومراز در سلول‌های میلومی می‌شود و هم‌چنین تلومراز نیز باعث افزایش بیان مسیر NF-κB می‌گردد (۱۱). بنابراین می‌توان با مهار فعالیت تلومراز، جلوی تکثیر بی‌رویه سلول‌ها را در MM گرفت و با افزایش آپوپتوز سلول‌های بدخیم، در بهبود علائم، به درمان بیماران کمک کرد.

MST-312 از اپی‌گالوکاتچین‌گالات (EGCG)، که کاتچین اصلی چای سبز است، مشتق شده است و به صورت مؤثر تلومراز را مهار می‌نماید (۱۲). این دارو می‌تواند در دوزهای بالا (۲ میکرومولار)، فعالیت ضد تلومرازی و سوق دادن سلول به سمت مرگ را داشته باشد (۱۳). هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر روی آپوپتوز سلول‌های میلومی U266 می‌باشد. با توجه به مطالعه‌های گذشته، رده سلولی میلومی U266 دارای فعالیت بالای آنزیم تلومراز بوده و چنانچه مهارکننده تلومراز بتواند مرگ سلول‌های میلومی را

ندارد(جدول ۱).

جدول ۱: حجم‌های مورد نیاز از محلول کار (۱۰۰ μM) برای تیمار سلول‌های میلومی با MST-312

غلظت مورد نظر دارو	حجم کل مورد نظر	حجم مورد نیاز از محلول کار دارو
۲ μM	۲ mL	۴۰ μL
۴ μM	۲ mL	۸۰ μL
۸ μM	۲ mL	۱۶۰ μL

بررسی زنده‌مانی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان بلو: برای بررسی تأثیر MST-312 روی زنده‌مانی سلولی، سلول‌های میلومی (U266) با رنگ تریپان بلو مواجه شدند. به طور خلاصه سلول‌ها در پلیت کشت سلولی ۱۲ خانه با تراکم  $2 \times 10^5$  سلول در هر خانه کشت داده و با غلظت‌های مختلف (۲، ۴ و ۸ میکرو مولار) داروی MST-312 تیمار شدند (۱۶، ۱۲). نمونه سلولی که مورد تیمار با MST-312 قرار نگرفته (غلظت صفر) به عنوان کنترل منفی استفاده شده است. پس از تیمار، پلیت کشت سلولی به انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای مرطوب حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> منتقل شد. پس از پایان انکوباسیون در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سوسپانسیون سلولی با محلول تریپان بلو ۰/۴٪ به نسبت ۱ به ۱ مخلوط شدند (۱۶، ۱۲). پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط مورد نظر بر روی لام نئوبار برده و در زیر میکروسکوب بررسی شد. سلول‌های زنده (شفاف) و مرده (آبی) شمارش شدند و زنده‌مانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. تعداد تکرار برای هر آزمایش سه بار بود.

$$100 \times (\text{تعداد کل سلول‌ها/تعداد سلول‌های زنده}) = \text{درصد زنده‌مانی}$$

بررسی فعالیت متابولیک سلول با روش MTT: تأثیر غلظت‌های مختلف MST-312 روی فعالیت متابولیکی سلول‌های میلومی با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT (سیگما - آلد ریچ، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت.

القا کند، می‌توان مهار تلومراز را به عنوان یک استراتژی درمانی در MM پیشنهاد نمود (۱۵، ۱۴، ۸).

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. در این مطالعه از رده‌ی سلولی توموری U266 که مربوط به بدخیمی میلومی مولتیپل می‌باشد، برای کشت استفاده شد. همان طور که گفته شد این سلول‌ها آنزیم تلومراز را بیان می‌کنند (۱۵، ۱۴، ۸). این رده سلولی از مرکز ملی ذخائر ژنتیک و زیستی ایران تهیه گردید. سلول‌های U266 در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪، پنی‌سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰ μg/mL streptomycin، penicillin ۱۰۰ μg/mL)، در انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوای حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند. محلول ذخیره MST-312 (سیگما - آلد ریچ، آمریکا) با حل کردن آن در DMSO تهیه شد. این دارو دارای جرم مولی ۳۸۰/۳۵ گرم بر مول می‌باشد. برای تهیه محلول ذخیره، ۵ میلی‌گرم دارو در ۱ میلی‌لیتر DMSO حل شد و غلظت ۱۳/۱۴ میلی‌مولار (۱۳۱۴۰ میکرومولار) به دست آمد.

غلظت ۱۰۰ میکرومولار محلول کار در حجم ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت (برای هر ران کاری) با استفاده از فرمول زیر تهیه شد.

$$M_1 V_1 = M_2 V_2 \longrightarrow 100 \mu\text{M} * 500 \mu\text{L} = 13140 \mu\text{M} * V_2 \longrightarrow V_2 = 3.8 \mu\text{L}$$

با استفاده از فرمول زیر حجم‌های مورد نیاز از محلول کار برای ایجاد غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار در حجم‌های مورد نظر به دست آمد.

$$M_1 V_1 = M_2 V_2 \longrightarrow 2 \mu\text{M} * 2\text{mL} = 100 \mu\text{M} * V_2 \longrightarrow V_2 = 40 \mu\text{L}$$

سلول‌های طبیعی منونوکلئار خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)) نیز در مطالعه‌های قبلی ما با داروی MST-312 تیمار شدند و نتایج نشان داد که این دارو هیچ تأثیر سیتوتوکسیسیته بر روی PBMC

شناسایی کننده آپوپتوز (آمریکا، BD بیوساینس) رنگ شدند. پس از خالی کردن PBS رویی، به هر پک سلولی  $100 \mu\text{L}$  بایندینگ بافر (X ۱)،  $5 \mu\text{L}$  آنکسین PE-V و  $5 \mu\text{L}$  محلول رنگ 7AAD اضافه شد. پس از یک ورتکس ملایم، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون،  $400 \mu\text{L}$  بایندینگ بافر (X ۱) به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و با دستگاه فلوسایتومتر Becton Dickinson FACS مورد آنالیز قرار گرفت. درصد سلول‌های آپوپتوزی با استفاده از نرم‌افزار Cell Ques تعیین شد. هر آزمایش سه مرتبه تکرار گردید. سلول‌هایی که آنکسین V مثبت و 7AAD منفی بودند، در فاز اولیه آپوپتوز در نظر گرفته شدند و سلول‌هایی که هم آنکسین V و هم 7AAD مثبتی داشتند، در مراحل انتهایی آپوپتوز در نظر گرفته شدند.

#### استخراج RNA و ساخت cDNA:

سلول‌های میلومی (U266) برای ۴۸ ساعت با داروی MST-312 تیمار شدند و RNA این سلول‌ها با استفاده از محلول TriPure (رُوش) استخراج شد. به طور خلاصه، سلول‌ها با مقدار تقریبی  $10^6 \times 5$  به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $2000 \text{ rpm}$  در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به پک سلولی یک میلی‌لیتر از محلول Tripure اضافه شده و سلول‌ها با استفاده از پیتاژ و حرکت محکم دست لیز شدند. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق،  $200$  میکرولیتر از محلول کلروفرم اضافه شده و پس از بستن درب میکروتیوب به مدت ۳۰ ثانیه با حرکت محکم دست تکان داده شد. سپس میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور  $1200 \text{ rpm}$  سانتریفوژ شدند.

در این مرحله ۳ فاز تشکیل شد که فاز رویی که شامل RNA می‌باشد برداشته شده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور  $12200 \text{ rpm}$  در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی خالی شد و به رسوب RNA، اتانول ۷۵٪ اضافه گردید.

MTT یک روش رنگ‌سنجی سریع، حساس و دقیق و بر پایه احیای نمک‌های تترازولیوم زرد رنگ به وسیله فعالیت‌های متابولیکی سلول زنده توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد که در نتیجه فرآیند احیا، بلورهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل می‌شود. سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری مقدار سنجی می‌شود. میزان بلور فورمازان ایجاد شده می‌تواند نشان‌دهنده درصد سلول‌های زنده باشد. به طور خلاصه،  $10^4$  سلول به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند و با غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرو مولار MST-312 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. حجم نهایی هر چاهک  $100 \mu\text{L}$  بود. نمونه سلولی که مورد تیمار با MST-312 قرار نگرفته (غلظت صفر) به عنوان کنترل منفی استفاده شده است.

بعد از گذشت ۴۸ ساعت، محیط چاهک‌ها خارج شد و سلول‌ها با  $100 \mu\text{L}$  از محلول MTT ( $5 \text{ mg/mL}$  در PBS فیلتر شده) به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بلورهای بنفش رنگ فورمازان ایجاد شده، با اضافه کردن  $100 \mu\text{L}$  محلول DMSO به هر چاهک حل شدند. میزان جذب نوری در طول موج  $570$  نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت متابولیک سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

$$100 \times (\text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست}) = \text{درصد فعالیت متابولیک سلولی}$$

#### بررسی آپوپتوز:

تأثیر MST-312 روی مرگ سلول‌های میلومی با استفاده از آنالیز آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، سلول‌های U266 در پلیت کشت سلول ۱۲ خانه با تراکم  $2 \times 10^5$  سلول در هر خانه کشت داده و با غلظت‌های مورد نظر (۲، ۴ و ۸ میکرومولار) MST-312 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نمونه سلولی که مورد تیمار با MST-312 قرار نگرفته (غلظت صفر) به عنوان کنترل منفی استفاده شده است. بعد از اتمام انکوباسیون، سلول‌ها دو مرتبه با PBS شسته شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از کیت آنکسین V

cDNA ساخته شده، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای جلوبرنده و معکوس (۱۰ pmol)، ۴ میکرولیتر آب تھی از نوکلئاز با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد (جدول ۲). چرخه‌های دمایی شامل مرحله فعال‌سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، و در ادامه با ۴۰ چرخه دمایی که هر چرخه دارای مرحله دناتوراسیون با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و یک مرحله ادغامی اتصال آغازگر و مرحله طویل‌سازی (annealing/elongation) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه می‌باشد. واکنش در دستگاه ABI Biosystem انجام شد و با استفاده از نرم‌افزار REST، داده‌های حاصل از Real time PCR آنالیز گردید. برای تأیید اختصاصی بودن محصولات تولید شده، آنالیز منحنی ذوب (melting curve) صورت گرفت. در این آنالیز محصولاتی که دارای طول و توالی یکسانی باشند دمای ذوب مشابهی داشته و منحنی ذوب آن‌ها روی هم قرار می‌گیرد (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، محصولات مربوط به تکثیر هر یک از ژن‌ها دارای دمای ذوب یکسانی بوده که دال بر اختصاصی بودن محصولات PCR هر ژن می‌باشد. از ژن GAPDH به عنوان ژن Housekeeping جهت نرمالیزه کردن نتایج بیان ژن‌ها استفاده شد. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش مقایسه‌ای  $\Delta\Delta CT$  طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد. بیان هر ژن سه بار تکرار گردید.  $\Delta\Delta CT$  با فرمول زیر محاسبه می‌شود.

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{treated}} - CT_{\text{control}})_{\text{targeted gene}} - (CT_{\text{treated}} - CT_{\text{control}})_{\text{GAPDH}}$$

Ct (threshold cycle): تلاقی بین منحنی تکثیر و خط آستانه

Treated: گروه تیمار شده با دارو

Control: گروه تیمار نشده با دارو

جدول ۲: توالی آغازگرهای معکوس و جلوبرنده ژن‌های BAX، BCL2 و GAPDH

نام ژن	توالی آغازگر جلوبرنده	توالی آغازگر معکوس
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGTATGGGATTTTC
BCL2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAG	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
BAX	AGGATCGAGCAGGGCGAATG	TCAGCTTCTGGTGGACGCA

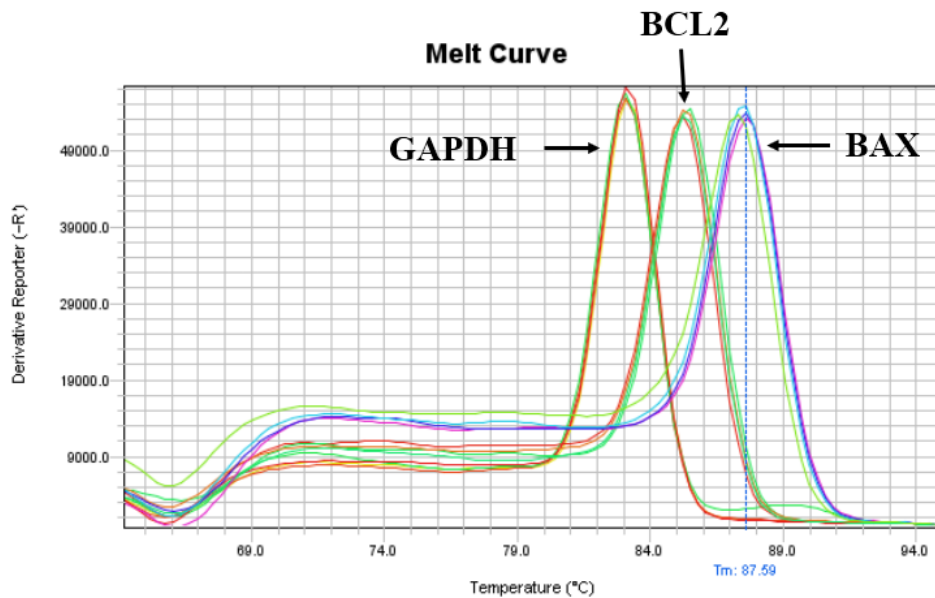
میکروتیوب‌ها چندین مرتبه سروته شدند و سپس ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ اعمال شد. ۱۰ دقیقه سانتی‌فیوژ با دور ۷۵۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس مایع رویی تخلیه و رسوب خشک شد. رسوب در ۲۰ میکرولیتر آب DEPC حل شد و در پایان ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ و ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد همراه با حرکت ملایم انجام گرفت. RNA های استخراج شده در منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت ساخت DNA مکمل (RevertAid First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis kit from Fermentas) تهیه شد. به طور خلاصه، برای ساخت cDNA، ۹ میکرولیتر آب تھی از نوکلئاز، ۱ میکرولیتر آغازگر رندوم هگزامر، ۴ میکرولیتر Reaction Buffer  $\times 5$ ، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر ۲۰ U/ $\mu$ L RiboLock RNase Inhibitor و ۱ میکرولیتر ترانس کریپتاز معکوس (RevertAid M-MuLV) (۲۰۰ U/ $\mu$ L) به عنوان مستر میکس، و ۲ میکرولیتر از RNA توتال (۱ میکروگرم در هر واکنش) در میکروتیوب با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش مخلوط گردید. هر واکنش ۲۰ میکرولیتری با برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت:

۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و به دنبال آن ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با حرارت دادن آن در ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه خاتمه یافت.

واکنش کمی Real-Time PCR:

واکنش Real-time PCR با استفاده از ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس گرین X ۲ (آمپلیکون، ۱/۵ میکرولیتر از



شکل ۱: منحنی دمای ذوب ژنهای *BAX*، *BCL2* و *GAPDH*

#### آنالیز آماری:

داده‌های مربوطه وارد SPSS۲۲ شد و مورد تجزیه و تحلیل آماری به روش Two-independent sample t-test قرار گرفت.

#### یافته‌ها

*MST-312* زنده‌مانی سلولی و فعالیت متابولیک سلول‌های میلوم مالتیپل را کاهش می‌دهد.

تأثیر غلظت‌های مختلف *MST-312* روی زنده‌مانی سلول‌های میلومی با استفاده از آزمون دفع تریان‌بلو بررسی گردید. همان‌طور که در نمودار ۱A مشاهده می‌شود، زنده‌مانی سلول‌های U266 مواجه شده با *MST-312* به صورت وابسته به دوز و زمان به طور قابل توجهی کاهش یافته است. بیش از ۵۰٪ کاهش در زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده در غلظت ۸ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد. با در نظر گرفتن کاهش شدید زنده‌مانی سلولی به دنبال مواجه طولانی مدت با *MST-312*، مدت زمان کوتاه ۴۸ ساعت برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. به منظور بررسی اثر *MST-312* روی فعالیت متابولیک سلول، سلول‌های میلومی با روش رنگ‌سنجی MTT مواجه شدند. همان‌طور که در نمودار ۱B مشاهده می‌شود،

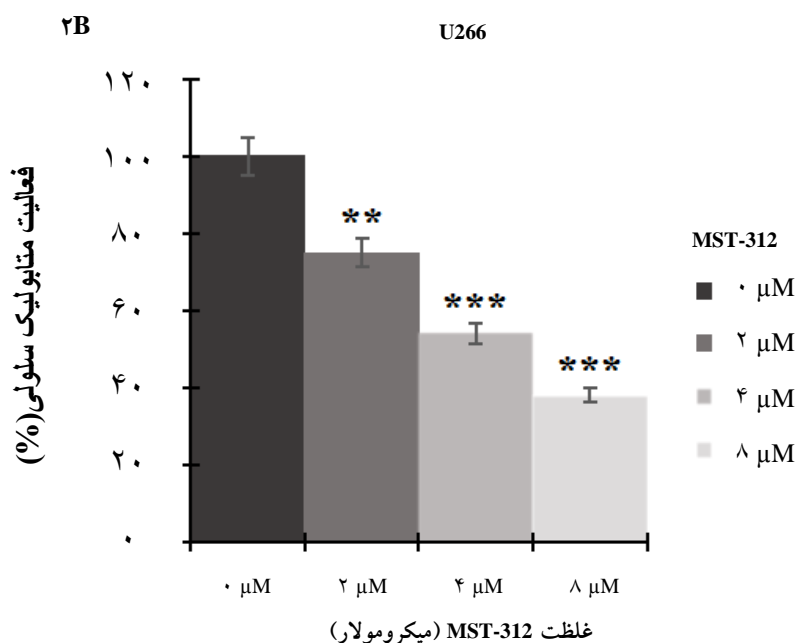
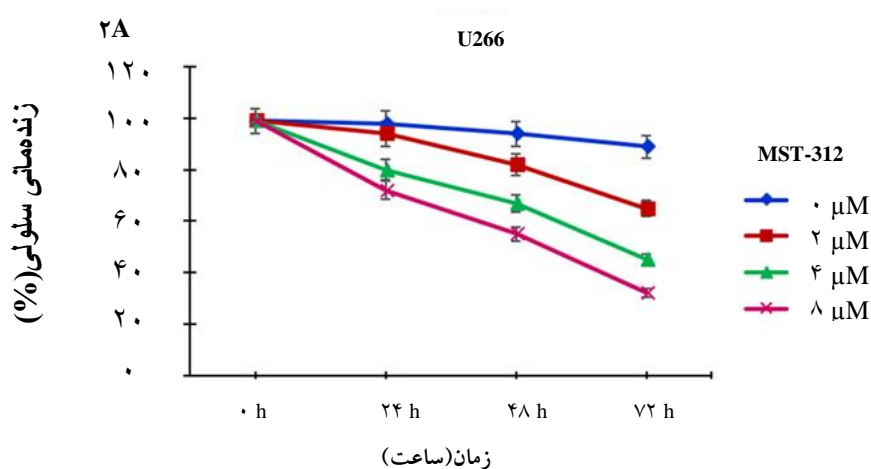
فعالیت متابولیک سلولی که مربوط به تعداد سلول‌های زنده می‌باشد، به طور مشخص در سلول‌های میلومی تیمار شده با *MST-312* کاهش یافته است. تأثیر کشندگی سلولی *MST-312* وابسته به دوز می‌باشد که تقریباً فعالیت متابولیک در سلول‌های U266 بعد از تیمار ۴۸ ساعته با دوزهای ۲، ۴ و ۸ میکرومولار *MST-312* به ترتیب ۲۵٪، ۴۶٪ و ۶۲٪ کاهش یافت. در نظر گرفتن همه این یافته‌ها، نشان می‌دهد که *MST-312* در زمان کوتاه می‌تواند کشندگی سلولی را روی سلول‌های میلومی اعمال کند.

#### *MST-312* آپوپتوز سلول‌های میلومی را افزایش می‌دهد:

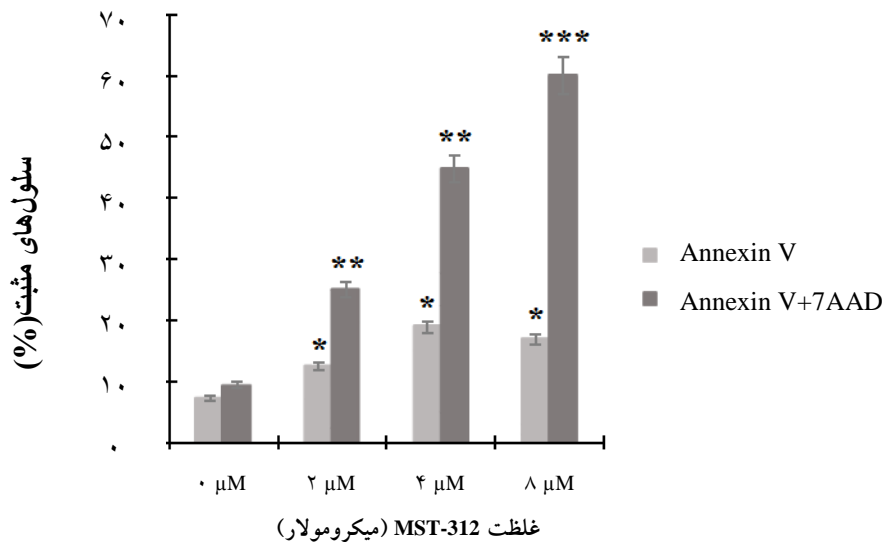
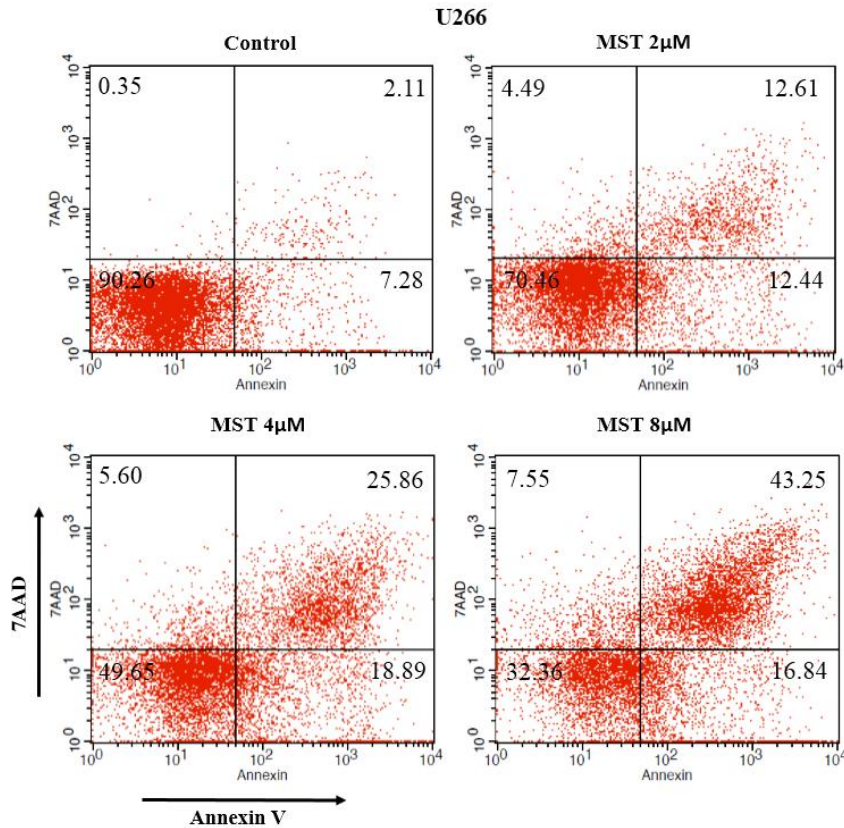
به منظور تعیین تأثیر *MST-312* روی آپوپتوز سلولی، سلول‌های میلومی برای اتصال آنکسین-V و آنکسین-V به همراه 7AAD توسط کیت PE آنکسین-V شناسایی‌کننده آپوپتوز آنالیز شدند. سلول‌های آنکسین منفی / 7-AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته می‌شوند؛ سلول‌های آنکسین مثبت / 7-AAD منفی در مرحله اولیه آپوپتوز قرار دارند؛ سلول‌های آنکسین مثبت / 7-AAD مثبت در مراحل انتهایی آپوپتوز قرار دارند و سلول‌های آنکسین منفی / 7-AAD مثبت نکروتیک تلقی می‌شوند (نمودار ۲). انکوباسیون کوتاه مدت سلول‌های

مثبت / 7AAD منفی و آنکسین-V مثبت / 7AAD مثبت) افزایش آپوتوز در سلول‌های U266 بعد از مواجهه کوتاه مدت (۴۸ ساعت) با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 دیده شد. این غلظت ۲ میکرومولار که با آپوتوز قابل توجهی همراه بود به عنوان غلظت مورد استفاده در بررسی بیان ژن انتخاب شد.

میلومی با MST-312 که به طور مشخص سلول‌های آنکسین-V مثبت / 7AAD منفی و آنکسین-V مثبت / 7AAD مثبت را افزایش می‌دهد؛ نشان‌دهنده تأثیر آپوتوتیک MST-312 روی سلول‌های میلومی می‌باشد. همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، تأثیر آپوتوزی وابسته به دوز بود و تقریباً ۳۰٪ (درصد توتال آنکسین-V

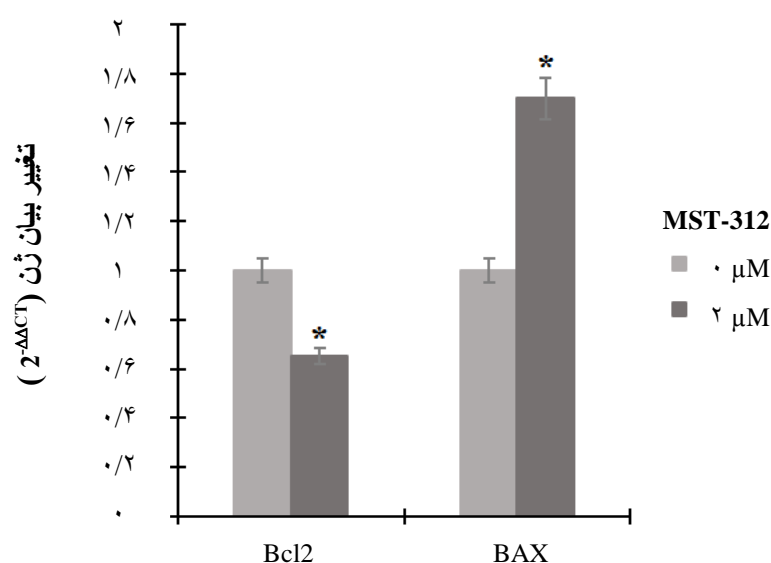


نمودار ۱: MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی سلولی و فعالیت متابولیکی سلول‌های میلومی می‌شود. در نمودار A سلول‌های میلومی U266 با غلظت‌های مختلف MST-312 مواجه شدند و زنده‌مانی سلولی با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو بعد از زمان‌های مختلف مواجهه بررسی شد. زنده‌مانی سلول‌های U266 بعد از مواجهه کوتاه مدت با MST-312 به طور قابل توجهی به صورت وابسته به دوز کاهش یافت. در نمودار B سلول‌های میلومی با غلظت‌های مختلف MST-312 تیمار شدند و فعالیت متابولیک با آزمون MTT بعد از مواجهه ۴۸ ساعته بررسی شد. فعالیت متابولیک سلول‌های میلومی مواجهه شده با MST-312 به طور قابل توجهی به صورت وابسته به دوز کاهش یافت ( $p < 0.001$ ) و  $p < 0.001$  (\*\*\*)).



نمودار ۲: تاثیر MST-312 روی آپوپتوز سلول‌های U266. سلول‌های U266 با غلظت‌های مختلف MST-312 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس اتصال این سلول‌ها به آنکسین-7AAD/ V مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های Annexin منفی / 7-AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته می‌شوند؛ سلول‌های Annexin مثبت / 7-AAD منفی در مرحله اولیه آپوپتوز قرار دارند؛ سلول‌های Annexin مثبت / 7-AAD مثبت در مراحل انتهایی آپوپتوز قرار دارند و سلول‌های Annexin منفی / 7-AAD مثبت نکروتیک تلقی می‌شوند. یک آزمایش از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است (\*\*\* $p < 0/001$  و \*\* $p < 0/01$  و \* $p < 0/05$ ).





نمودار ۳: MST-312 بیان ژن *BCL2* را کاهش و بیان ژن *BAX* را افزایش می‌دهد. بعد از تیمار سلول‌های U266 با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 به مدت ۴۸ ساعت، RNA سلول استخراج گردید و ساخت cDNA انجام شد. نتایج Real-Time PCR با روش سایبرگرین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نشان داده شده است. تمام مقادیر با بیان ژن *GAPDH* نرمالیزه شده‌اند ( $p < 0.05$ ).

جدول ۳: مقادیر میانگین Ct گروه کنترل و گروه تیمار شده با دوز ۲ میکرومولار و میزان تغییر بیان ژن‌های *BAX*، *BCL2*

نام ژن	میانگین CT (سه بار تکرار) گروه تیمار نشده (کنترل)	میانگین CT (سه بار تکرار) گروه تیمار شده (دوز ۲ میکرومولار)	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (تغییر بیان ژن)
<i>GAPDH</i>	۱۵/۰۳	۱۵/۰۱	۱
<i>BCL2</i>	۲۵/۴۶	۲۶/۰۹	۰/۶۵
<i>BAX</i>	۲۱/۹۳	۲۱/۱۴	۱/۷

### بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی، کاهش فعالیت متابولیک و افزایش آپوتوز سلولی می‌شود. این دارو با مهار تلومراز و القای آپوتوز در سلول‌های میلومی می‌تواند به عنوان کاندیدی در درمان میلومالتیپل باشد.

در حال حاضر هدف قرار دادن یک مارکر مشخص (درمان هدفمند) در سلول‌های بدخیم برای درمان سرطان اهمیت به سزایی دارد. علی‌رغم این که سلول‌های توموری در علائم بالینی تفاوت‌های زیادی دارند ولی این سلول‌ها برای بدخیم بودن مجموعه‌ای از شرایط مشابه دارند. در میان این مارکرها داشتن پتانسیل همانندسازی نامحدود، گامی کلیدی برای رشد و تکثیر تومور

*MST-312* بیان ژن *Bcl2* را کاهش و بیان ژن *BAX* را افزایش می‌دهد.

ژن‌های *BAX* و *BCL2* اعضای خانواده *Bcl-2* می‌باشند. ژن *BAX* و پروتئین حاصل از آن به عنوان فعال‌کننده آپوتوز و ژن *BCL2* و پروتئین حاصل از آن به عنوان مهارکننده آپوتوز عمل می‌کنند. برای بررسی بیان ژن از غلظت ۲ میکرومولار که در بررسی فلوسایتومتری با آپوتوز قابل توجهی همراه بود استفاده شد. در سلول‌های میلومی تیمار شده با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 برای مدت کوتاه (۴۸ ساعت)، بیان ژن *BAX* افزایش یافته و بیان ژن *BCL2* کاهش یافته است که نشان می‌دهد MST-312 باعث القای آپوتوز در سلول‌های میلومی می‌شود (نمودار ۳ و جدول ۳).

بررسی قرار گرفت؛ آن‌ها یافتند که بقای بیماران که بیان بالایی از فعالیت تلومراز دارند، به طور قابل توجه بعد از نمونه‌گیری کوتاه می‌باشد. اندازه‌گیری فعالیت تلومراز در سلول‌های میلومی مارکری قابل اعتماد برای نشان دادن ظرفیت پرولیفراسیون و توده توموری در بیماران مبتلا به میلوم مالتیپل است (۱۷). در مطالعه ونگ، مهار شدن تلومراز به وسیله تیوفوسفورامیدات مکمل ناحیه الگوی تلومراز (GRN163) روی رده سلولی میلومی، رده سلولی لنفوم غیر هوچکین، سلول‌های گرفته شده از بیماران مبتلا به میلوم مالتیپل (MM) و مدل زنوگرافت تومور بررسی شد. تیمار سلول‌ها با GRN163 سطح تلومراز را در همه سلول‌ها کاهش داد و کوتاه شدن تلومر را تسریع کرد. GRN163 رشد زنوگرافت MM و لنفوم غیر هوچکین ناشی از رده‌های سلولی با طول کوتاه تلومر را مهار کرد و آپوپتوز سلول‌های توموری را افزایش داد. هم‌چنین استفاده سیستمیک روزانه داخل پری‌توئن GRN163 در مدل زنوگرافت میلوما با طول کوتاه تلومر، باعث کاهش سطح تلومراز و کاهش حجم تومور شد. این اطلاعات نشان داد که تلومراز با حفظ تلومر نقش مهمی در همانندسازی نئوپلاسم‌های سلول B دارد و آن‌ها پیشنهاد کردند که مهار تلومراز رویکرد درمانی جدید برای میلوم مالتیپل و لنفوم غیر هوچکین می‌باشد (۱۸). در مطالعه ویس و همکاران رده‌های سلولی میلومی و سلول‌های گرفته شده از بیماران مبتلا به مالتیپل میلوما با داروی بورتزومیب (bortezomib) تیمار شدند و تأثیر آن روی فعالیت تلومراز و پرولیفراسیون سلولی بررسی گردید. بورتزومیب باعث تنظیم کاهشی فعالیت تلومراز در سلول‌های میلومی هم در زمان رونویسی و هم بعد از رونویسی می‌شود (۱۴). در مطالعه ژی‌هوا سلول‌های میلومی U266 با غلظت‌های مختلف مهارکننده تلومراز زیدوودین (zidovudine) تیمار شدند و میزان بیان تلومراز با روش TRAP و فعالیت متابولیکی سلولی با روش MTT بررسی شد. بقای سلول‌های میلومی U266 تیمار شده با زیدوودین در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجه کاهش یافت. فعالیت تلومراز بعد از تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار برای ۷۲ ساعت به میزان ۵۵٪ کاهش یافت.

می‌باشد (۴). در این رابطه می‌توان گفت که تلومراز آنزیمی است که تلومرها را گسترش می‌دهد و از فرآیند پیرشدن همانندسازی جلوگیری می‌کند (۱۱). تلومراز در اکثر سرطان‌های انسانی بیان می‌شود، بنابراین هدف قرار دادن آن یکی از رویکردهای درمانی مؤثر برای درمان سرطان می‌باشد (۹). در این رابطه انواع مختلفی از داروهای ضد تلومراز در فاز I و II کارآزمایی بالینی هستند (۴). در مطالعه‌های فراوان، نقش و اهمیت تلومراز در مالتیپل میلوما به خوبی بیان شده است. در مطالعه حاضر سلول‌های U266 که آنزیم تلومراز را بیان می‌کنند، با داروی MST-312 تیمار شدند (۱۵، ۱۴، ۸). همان‌طور که در نتایج نشان داده است، تیمار کوتاه مدت سلول‌های میلومی با MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیک سلول شد (شکل ۲). به علاوه، تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۲ میکرومولار این دارو، باعث افزایش ۳۰٪ آپوپتوز در این سلول‌ها گردید (شکل ۳). هم‌چنین مطابق با نتایج مطالعه‌های دیگر، بررسی سطح بیان ژن‌های BAX و BCL2 نیز نشان داد که این دارو با افزایش بیان BAX کاهش بیان BCL2 باعث القای آپوپتوز در سلول‌های میلومی U266 می‌شود (شکل ۴). در مطالعه‌های قبلی ما، سلول‌های طبیعی منونوکلئار خون محیطی (PBMC) نیز با داروی MST-312 تیمار شدند، نتایج نشان داد که این دارو هیچ تأثیر سیتوتوکسیستی بر روی سلول‌های طبیعی منونوکلئار خون محیطی ندارد. در واقع بعد از تیمار سلول‌های PBMC با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار این دارو، آپوپتوز سلولی با اتصال به آنکسین PI / V مورد بررسی قرار گرفت. میزان آپوپتوز سلولی بعد از تیمار دارو با دوز ۲ میکرومولار مساوی با گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده با دارو) بود و افزایش در آپوپتوز سلولی مشاهده نشد؛ این نتایج نشان می‌دهد که این داروی مهارکننده تلومراز به صورت انتخابی بر روی سلول‌های توموری که دارای فعالیت بالای تلومراز می‌باشند اثر می‌گذارد اما سلول‌های طبیعی که فاقد تلومراز هستند متاثر نمی‌شوند (۱۶).

در مطالعه شیراتسوجی و همکاران، فعالیت تلومراز در سلول‌های میلومی به عنوان فاکتور پیش‌آگهی‌دهنده مورد

را کاهش دهد. حجم توموری و توانایی هجوم سلولی با تیمار هم‌زمان سلول‌ها با این دو دارو کاهش یافت. مطالعه آن‌ها، استفاده هم‌زمان از دو داروی فلاوونوئید مورین و مهارکننده تلومراز MST-312 را به عنوان درمان هدفمند برای بهبود پیش‌آگهی سرطان کولون و پستان معرفی کردند (۲۱). در مطالعه‌های گذشته بیان شده است که پرتوتابی در سلول‌های بدخیم باعث افزایش فعالیت تلومراز می‌شود و هم‌چنین باعث افزایش مقاومت به پرتو درمانی بعدی می‌شود. در این رابطه ونگ و همکارانش آنزیم تلومراز را با داروی MST-312 در رده سلولی کارسینوم کبد HepG2 مهار کردند و میزان حساسیت به پرتوتابی این سلول‌ها را قبل و بعد از تیمار با دارو بررسی کردند. آن‌ها یافتند که این دارو به طور مؤثر فعالیت تلومراز را مهار می‌کند و نشان دادند که غلظت ۴ میکرومولار دارو، کشندگی ضعیفی روی سلول‌های HepG2 دارد. در مقایسه با پرتوتابی به تنهایی، تیمار سلول‌ها با غلظت ۴ میکرومولار و به دنبال آن تیمار با اشعه X، پتانسیل کلون‌زایی تومور را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد.

مطالعه آن‌ها نشان داد که تداخل در عملکرد تلومراز می‌تواند حساسیت به پرتوتابی را در سلول‌های HepG2 نسبت به اشعه X افزایش دهد و هم‌چنین MST-312 می‌تواند به عنوان درمان کمکی به همراه پرتوتابی در درمان بدخیمی مؤثر باشد (۲۲). در مطالعه سرانو سلول‌های سرطان ریه با داروی MST-312 تیمار شدند. در این مطالعه MST-312 تأثیر آنتی‌تلومرازی قوی روی سلول‌های سرطان ریه دارد و باعث القای p21 و p27 و آپوپتوز در همه جمعیت سلولی می‌شود (۱۳).

هم‌چنین در مطالعه گورانگ، تأثیر داروی MST-312 بر روی سلول‌های توموری سرطان پستان نیز بررسی شده است. این دارو در زمان کوتاه (۴۸ ساعت) با کاهش فعالیت تلومرازی و القای عملکرد بد تلومر باعث توقف رشد در سلول‌های سرطانی پستان شد (۲۳). مطابق با نتایج مطالعه‌های دیگر، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار کوتاه مدت سلول‌های میلومی با MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیک سلول و القای آپوپتوز

زیدوودین به طور مؤثر فعالیت تلومراز را در میلوم مالپیل مهار می‌کند و از پروليفراسیون آن‌ها جلوگیری می‌نماید (۱۵). در مطالعه سیمیا و همکارانش، MST-312 به عنوان کانیدی قابل اعتماد برای هدف قرار دادن تلومراز معرفی شده است (۱۲). مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که استفاده از این دارو سلول را در مرحله G0-G1 نگه می‌دارد. تیمار کردن بعضی تومورها با این دارو با دو مکانیسم، موجب مهار عملکرد تلومراز می‌شود. تیمار مداوم تومور با دارو موجب کوتاهی طول تلومر و در نتیجه کاهش تکثیر می‌گردد، و تیمار کوتاه مدت با دارو باعث اثرات حاد در سلول شده، به طوری که باعث تخریب DNA و مهار حیات آن می‌شود (۱۱). هم‌چنین نشان داده شده است که کاهش طول تلومر با استفاده از MST-312، ۲۹ جفت باز بوده و بنابراین این ترکیب، باعث ایجاد اختلال در رونویسی قسمت انتهایی کروموزوم می‌شود. مطالعه‌های قبلی کاهش ۶۷ درصدی فعالیت تلومراز را با استفاده از MST-312 در رده سلولی U937 نشان داده‌اند (۱۲). سیمیا و همکارانش ثابت کردند که استفاده از MST312 باعث القای پیری در ۵۸٪ کل سلول‌های کشت داده شده می‌شود، که این کار را با بررسی بیان SA- $\beta$ -Gal activity که مارکری برای بررسی پیری است انجام دادند (۱۹، ۱۲). در مطالعه ونگ و همکاران، سلول‌های تومور مغزی Ependymomas مورد بررسی قرار گرفت. در این تومور مغزی، بیان آنزیم تلومراز باعث پیش‌آگهی ضعیف بیماری می‌شود. در مطالعه آن‌ها، بیان تلومراز اندازه‌گیری شد، سلول‌ها نیز با غلظت ۱ میکرومولار داروی MST-312 به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و میزان آپوپتوز سلولی بررسی گردید. آن‌ها مشاهده کردند که بیان تلومراز در این سلول‌ها بالا می‌باشد و بعد از تیمار با MST-312 تعداد سلول‌ها به شدت کاهش می‌یابد و آپوپتوز سلولی افزایش می‌یابد (۲۰). در مطالعه چانگ و همکاران سلول‌های سرطان روده بزرگ (کولون) HT-29 و سرطان پستان MDA-MB-231 به طور هم‌زمان با داروی فلاوونوئید مورین (flavonoid morin) به همراه مهارکننده تلومراز MST-312 تیمار شدند تا تعداد سلول‌های بنیادی سرطانی

افزایش آپوپتوز سلولی می‌شود. با توجه نتایج مطالعه حاضر، این دارو با مهار تلومراز و القای آپوپتوز در سلول‌های میلومی می‌تواند به عنوان کاندیدی جهت درمان میلوم مالتیپل پیشنهاد شود.

می‌شود.

### نتیجه گیری

تیمار کوتاه مدت سلول‌های سرطانی میلومی با MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی، کاهش فعالیت متابولیک و

### References:

- 1- Urashima M, Ogata A, Chauhan D, Hatziyanni M, Vidriales M, Dederá D, *et al.* Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood* 1996; 87(5): 1928-38.
- 2- Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11(1): 27-42.
- 3- Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(1): 49-60.
- 4- Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57(3): 191-214.
- 5- Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoph K, Haggard W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 2004; 27(1 Suppl): S161-5.
- 6- Reagan MR, Liaw L, Rosen CJ, Ghobrial IM. Dynamic interplay between bone and multiple myeloma: emerging roles of the osteoblast. *Bone* 2015; 75: 161-9.
- 7- Bataille R, Chappard D, Alexandre C, Dessauw P, Sany J. Importance of quantitative histology of bone changes in monoclonal gammopathy. *Br J Cancer* 1986; 53(6): 805-10.
- 8- Shamma MA, Reis RJS, Akiyama M, Koley H, Chauhan D, Hideshima T, *et al.* Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(9): 825-33.
- 9- Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol* 1996; 16(1): 53-65.
- 10- Reuter S, Prasad S, Phromnoi K, Kannappan R, Yadav VR, Aggarwal BB. Embelin suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF-κB ligand and tumor cells *in vitro* through inhibition of the NF-κB cell signaling pathway. *Mol Cancer Res* 2010; 8(10): 1425-36.
- 11- Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(9): 426-34.
- 12- Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K, *et al.* Telomere Shortening and Growth Inhibition of Human Cancer Cells by Novel Synthetic Telomerase Inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(9): 657-65.
- 13- Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, Fernandez-Marcelo T, Iniesta P, Ortiz-de-Solorzano C, *et al.* Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. *Mol Cancer* 2011; 10(1): 96.
- 14- Weiss C, Uziel O, Wolach O, Nordenberg J, Beery E, Bulvick S, *et al.* Differential downregulation of telomerase activity by bortezomib in multiple myeloma cells-multiple regulatory pathways *in vitro* and *ex vivo*. *Br J Cancer* 2012; 107(11): 1844-52.
- 15- Zhihua Z, Miaomiao S, Jianping Y, Kuisheng C. Research for the influence of telomerase inhibitors on myeloma cell and therapy. *Pak J Pharm Sci* 2014; 27(5 Suppl): 1641-4.
- 16- Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-κB pathway. *Tumour Biol* 2015; 36(11): 8425-37.
- 17- Shiratsuchi M, Muta K, Abe Y, Motomura S, Taguchi F, Takatsuki H, *et al.* Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. *Cancer* 2002; 94(8): 2232-8.
- 18- Wang ES, Wu K, Chin AC, Chen-Kiang S, Pongracz K, Gryaznov S, *et al.* Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: *in vitro* and *in vivo* studies in multiple myeloma and lymphoma. *Blood* 2004; 103(1): 258-66.
- 19- Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 1995; 85(4): 863-72.
- 20- Wong VC, Morrison A, Tabori U, Hawkins CE. Telomerase inhibition as a novel therapy for pediatric ependymoma. *Brain Pathol* 2010; 20(4): 780-6.
- 21- Chung SS, Oliva B, Dwabe S, Vadgama JV. Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST-312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. *Int J Oncol* 2016; 49(2): 487-98.
- 22- Wang Y, Sun C, Mao A, Zhang X, Zhou X, Wang Z, *et al.* Radiosensitization to X-ray radiation by telomerase inhibitor MST-312 in human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci* 2015; 123: 43-50.
- 23- Gurung RL, Lim SN, Low GKM, Hande MP. MST-312 alters telomere dynamics, gene expression profiles and growth in human breast cancer cells. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2014; 7(4-6): 283-98.

Original Article

## Investigation of telomerase inhibition effect on apoptosis of myeloma cell line U266

Ameri Z.<sup>1</sup>, Ghiasi S.<sup>1</sup>, Farsinejad A.R.<sup>1</sup>, Ehsan M.<sup>1</sup>, Aghajani S.<sup>1</sup>, Pur Yazdan Panah N.<sup>1</sup>, Kazemzadeh Sh.<sup>2</sup>, Fatemi A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>2</sup>Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Abstract

#### Background and Objectives

Telomerase-targeted therapy for cancer has received great attention because telomerase is expressed in almost all cancer cells but is inactive in most normal somatic cells. This study aimed to investigate the effects of telomerase inhibitor MST-312, a chemically modified derivative of epigallocatechin gallate (EGCG), on apoptosis of myeloma cell line U266.

#### Materials and Methods

In an Experimental study, U266 cells were treated with different concentrations of MST-312 at different times; then, cell viability by trypan blue exclusion assay, cell metabolic activity by MTT assay, and cell apoptosis by Annexin V Apoptosis Detection Kit were measured. To further investigate apoptosis, BAX and BCL2 gene expression of the treated cells was investigated by the quantitative Real-Time PCR.

#### Results

MST-312 exerted a dose-dependent short-term cytotoxic effect on myeloma cells. Over 50% decrease in the viability of treated cells was seen in 8  $\mu$ M concentration of MST-312 within 48 h. The cytotoxic effect of MST-312 was concentration-dependent, with approximately 25, 46, and 62% reduction in metabolic activity after 48 h exposure to 2, 4, and 8  $\mu$ M of MST-312, respectively. Gene expression analysis showed downregulation of antiapoptotic gene Bcl-2 and upregulation of apoptotic gene BAX.

#### Conclusions

Inhibition of telomerase activity by MST-312 represents a novel treatment strategy for Multiple Myeloma cancer.

**Key words:** Apoptosis, Multiple Myeloma, Telomerase

Received: 20 May 2017

Accepted: 11 Jul 2017

Correspondence: Fatemi A., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences.

Postal Code: 7619794435, Kerman, Iran. Tel: (+9834) 32112007; Fax: (+9834) 31325375

E-mail: ahmad.fatemi2@gmail.com