

تأثیر هارمالین بر بیان ژن *Dnmt1* و هیپومتیلایسیون پروموتور ژن *P15* در رده سلولی لوسمیک NB4

پریسا نیکخو^۱، آرزو اودی^۲، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی^۳

چکیده

سابقه و هدف

متیلایسیون DNA در ناحیه پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور از جمله *P15*، به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های ایجاد بدخیمی‌های خونی مطرح است. هارمالین یکی از آلکالوئیدهای مشتق شده از گیاه اسپند است که دارای خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو بر روی رده‌های سلولی لوسمیک می‌باشد. در این مقاله تأثیر هارمالین بر کاهش بیان ژن *Dnmt1* و هیپومتیلایسیون ناحیه پروموتور ژن *P15* در رده سلولی NB4 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی با استفاده از روش MTT، تأثیرات سیتوتوکسیک بر رده سلولی NB4 تا ۷۲ ساعت بررسی شد. جهت بررسی چرخه سلولی پس از تیمار با هارمالین، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. وضعیت متیلایسیون پروموتور ژن *P15* با استفاده از روش Methylation specific PCR بررسی شد. با استفاده از روش Real-time PCR، میزان بیان ژن‌های *Dnmt1* و *P15* بررسی گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که داروی هارمالین از غلظت ۱۵ µg/mL به بالا، پس از ۴۸ ساعت به صورت وابسته به دوز و زمان دارای خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو بر روی رده سلولی NB4 می‌باشد. آنالیز چرخه سلولی نشان‌دهنده ایست سلول‌ها در فاز G0G1 است. هارمالین در غلظت ۱۵ µg/mL موجب کاهش بیان ژن *Dnmt1*، هیپومتیلایسیون پروموتور ژن *P15* و افزایش مجدد بیان ژن *P15* در رده سلولی NB4 می‌شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر بخشی داروی هارمالین بر کاهش بیان ژن *Dnmt1* و هیپومتیلایسیون پروموتور و افزایش بیان ژن *P15* در این رده سلولی، می‌توان چنین پیشنهاد کرد که این دارو می‌تواند به عنوان یک راه‌کار درمانی مناسب به صورت منوتراپی و یا داروی مکمل همراه با داروهای متداول لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: متیلایسیون، ژن، لوسمی

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۲۹

۱- کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات - تهران - ایران
 ۲- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
 ۳- PhD ایمنی سلولی و مولکولی - استادیار گروه ژنتیک سلولی و مولکولی - دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات - تهران - ایران

مقدمه

سرطان خون و یا لوسمی یک اختلال نئوپلاستی است که در سلول‌های مغز استخوان به وجود می‌آید و به دنبال آن کلون این سلول‌ها گسترش یافته و وارد خون و بافت‌ها می‌شوند. اختلالات سلول‌های لوسمی ناشی از تغییرات ژنتیکی، اپی‌ژنتیکی و یا تلفیقی از این دو می‌باشند (۱). با توجه به بروز اولیه تغییرات اپی‌ژنتیک و برگشت‌پذیر بودن این تغییرات، پژوهش‌های متعددی در زمینه شناخت تغییرات اپی‌ژنتیک انجام گرفته است و تلاش‌ها جهت فهم مکانیسم و چگونگی بروز این تغییرات، به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است.

تغییرات اپی‌ژنتیک و از جمله متیلاسیون DNA در ناحیه پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های ایجاد بدخیمی‌های خونی مطرح است. این فرایندها که برگشت‌پذیر هم می‌باشند، بدون تغییر در سکانس DNA بیان ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. متیلاسیون DNA در ناحیه پروموتور ژن‌های سرکوبگر تومور به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های ایجاد بدخیمی‌های خونی مطرح است. متیلاسیون DNA توسط آنزیم‌های Dnmts صورت می‌گیرد که مهمترین آن Dnmt1 می‌باشد (۲). هیپرمتیلاسیون نابه‌جای پروموتور ژن‌های سرکوب‌کننده تومور (TSG) توسط آنزیم Dnmt1 موجب خاموشی این ژن‌ها و شکل‌گیری انواع لوسمی‌ها می‌شود. P15 از پروتئین‌های تنظیمی چرخه سلولی می‌باشد که به صورت تنظیم‌کننده منفی در چرخه عمل می‌کند. هیپرمتیلاسیون پروموتور این ژن‌ها باعث کاهش بیان این پروتئین شده، این امر باعث کاهش نقاط کنترل چرخه سلولی گردیده و می‌تواند باعث افزایش خطر سرطانی شدن سلول شود (۳). هیپرمتیلاسیون DNA در ژن P15 در ۴۵٪ از موارد AML و ۱۴٪ از تمام موارد ALL شناسایی شده است (۴). با توجه به بروز اولیه تغییرات اپی‌ژنتیک و برگشت‌پذیر بودن این تغییرات، پژوهش‌های متعددی به سمت و سوی شناخت مهارکننده‌های Dnmt1 معطوف گشته است. ۵- آزاسیتیدین و دسیتابین به عنوان دو عامل هیپومتیل‌کننده DNA و مورد تایید FDA در درمان لوسمی‌های حاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود

داروهای آزانوکلئوزیدی فوق به دلیل عملکرد غیر اختصاصی در اتصال به DNA، تاثیرگذاری محدود آن‌ها در فاز سلولی S و هم چنین استفاده نامناسب از این داروها در درمان لوسمی‌های هیپوپرولیفراتیو محدودیت‌های کاربردی دارد. به همین دلیل این عرصه به سمت مهارکننده‌های سنتتیک غیر نوکلئوزیدی مثل پروکینامید پیش رفت، البته این مهارکننده‌ها نیز از قدرت هیپومتیلاسیون ناچیزی برخوردار می‌باشند. لذا امروزه استفاده از مواد طبیعی که دارای اثر هیپومتیلاسیون بر DNA می‌باشند، مورد توجه فراوان قرار گرفته است (۵). برای مثال کورکامین، پلی‌فنل‌های چای سبز نمونه‌هایی قابل ذکر از این منبع عظیم می‌باشند که علاوه بر این که فاقد محدودیت‌ها و عوارض مهارکننده‌های سنتتیک می‌باشند با مکانیسم‌های مختلف در القای هیپومتیلاسیون پروموتور ژن‌های کنترل چرخه سلولی و تاثیر بر بیان ژن Dnmt1 عمل می‌کنند. هارمالین یکی از آلکالوئیدهای مشتق شده از گیاه اسپند است که دارای خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو بر روی رده‌های سلولی لوسمی می‌باشد؛ ولی مکانیسم عمل و چگونگی عملکرد این دارو در القای این اثر آنتی‌پرولیفراتیو مشخص نشده است. در این مقاله عوامل دخیل در القای این اثر آنتی‌پرولیفراتیو بررسی شد و تاثیر هارمالین بر چرخه سلولی، هیپومتیلاسیون ناحیه پروموتور ژن P15، همچنین بیان مجدد ژن P15 در رده سلولی NB4 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تیمار با داروی هارمالین:

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شدند. تعداد $10^6 \times 1/5$ سلول NB4 در هر میلی‌لیتر به صورت سوسپانسیونی در محیط حاوی RPMI ۱۶۴۰ (آلمان، سیگما) همراه با FBS ۱۰٪، U/mL ۱۰۰ پنی‌سیلین و ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ استرپتومایسین (آمریکا، سنت لوئیس و سیگما) در دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 کشت داده شد. تعداد $10^6 \times 0/3$ سلول NB4 در هر چاهک از پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳ روز تحت تاثیر غلظت‌های $10 \mu\text{g/mL}$ ،

بلورهای فورومازان ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و پس از هموژن کردن هر پلیت، توسط دستگاه الیزا ریدر جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

ارزیابی چرخه سلولی با استفاده رنگ PI و فلوسیتومتری:
آنالیز چرخه سلولی یکی از اولین کاربردهای فلوسیتومتری به شمار می‌رود. اصول این آنالیز بر اساس رنگ‌آمیزی DNA سلول با رنگ‌های مخصوص DNA است، به طوری که میزان رنگ جذب شده متناسب با محتوای DNA سلول می‌باشد و چرخه سلولی دارای ۴ مرحله متمایز است: G1SG2M همه سلول‌ها در فاز G1 محتوای یکسان DNA دارند و بنابراین یک پیک باریک در نمودار فلورسانس به دست می‌آید، ضریب تغییرات (CV) عرض پیک را نشانه می‌دهد. سلول‌ها در فاز G2/M دو برابر محتوای DNA در فاز G1 را دارند، بنابراین پیک ایجاد شده در موقعیت دو برابر پیک G1 قرار دارد. از نظر تئوری، نسبت G2 به G1، ۲ به ۱ است اما در عمل معمولاً کمتر از آن به دست می‌آید. فاصله بین G1 و G2 توسط سلول‌هایی که در فاز S هستند اشغال شده است.

سلول‌های NB4 کشت داده شده (1×10^6) تحت تاثیر غلظت‌های (۱۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۰ $\mu\text{g/mL}$) هارمالین در مدت زمان دو روز انکوبه شدند. سپس سلول‌ها را دو بار با ۲۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده و بعد از آخرین شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر PBS به توده سلولی اضافه شده و سوسپانسیون سلولی تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون برداشته شده و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر RNase اضافه شد و سپس ۵۰ میکرولیتر تریتون ۱٪ و ۰/۵ میکرولیتر رنگ PI افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در این مرحله نمونه‌ها جهت ارائه به دستگاه فلوسیتومتری آماده شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

سلول‌های کشت داده شده NB4، تحت تاثیر غلظت ۱۵ $\mu\text{g/mL}$ هارمالین در مدت زمان دو روز انکوبه شد. سلول‌های موجود در فلاسک را شمارش و آن‌ها را در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و در دور ۱۰۰۰ g به

۱۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۰ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۵ $\mu\text{g/mL}$ و ۳۰ $\mu\text{g/mL}$ هارمالین (آمریکا، سیگما) و غلظت ۲ μM از ۵-آزاسیتیدین (آمریکا، سیگما) به عنوان کنترل مثبت مورد مطالعه قرار گرفتند. هارمالین در اتانول خالص و ۵-آزاسیتیدین (کنترل مثبت) در حجم مساوی آب مقطر و استیک اسید حل شد.

ارزیابی زنده‌مانی و شمارش سلولی با استفاده از رنگ تریپان بلو:

تعداد $10^6 \times 0.3$ از سلول‌های NB4 در پلیت‌های ۶ خانه‌ای با غلظت‌های مختلف هارمالین و در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده و با استفاده از رنگ تریپان‌بلو (آلمان، مرک) ۰/۴٪ و لام نتوبار مورد مطالعه قرار گرفته شد. در این آزمایش سلول‌های مرده نسبت به تریپان‌بلو نفوذپذیر هستند و رنگ را جذب می‌کند اما سلول‌های زنده نسبت به این رنگ نفوذ ناپذیر است. برای شمارش سلول‌های زنده سلول‌های بدون رنگ را در خانه‌های گلوب سفید شمارش شد و میانگین گرفته شد.

ارزیابی تاثیر سایتوتوکسیک هارمالین با استفاده از روش MTT:

به منظور بررسی تاثیرات سایتوتوکسیک داروها به روش سنجش MTT، به هر چاهک از پلیت ۹۶ تایی، $10^6 \times 0.15$ سلول تحت تاثیر غلظت‌های مختلف دارو (۱۰ $\mu\text{g/mL}$ ، ۱۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۰ $\mu\text{g/mL}$ ، ۲۵ $\mu\text{g/mL}$ ، ۳۰ $\mu\text{g/mL}$) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. چاهک‌هایی که تنها حاوی محیط کشت و سلول است و دارویی ندارد، به عنوان گروه کنترل منفی استفاده شدند. پلیت‌های آماده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 قرارداده شدند. با توجه به این که زمان‌های مختلف ۱ تا ۳ روز برای انکوباسیون سلول‌ها با رقت‌های مختلف دارویی در نظر گرفته شده بودند، بعد از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک محلول MTT به غلظت ۵ mg/mL و حجم ۱۰ میکرولیتر افزوده شد و سپس پلیت‌ها ۴ تا ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از به اتمام رسیدن این ۴-۶ ساعت به هر چاهک به منظور حل شدن

دستورالعمل این کیت انجام گرفته شد. از cDNA ساخته شده یک PCR با آغازگر GAPDH (ژن خانه‌دار) و آغازگر Dnmt1 و P15 قبل از Real Time PCR انجام شد و سپس بر روی ژل ۱/۵٪، کیفیت cDNA ساخته شده بررسی گردید.

Real-time PCR:

آزمون Real time PCR در دستگاه RotorGene 3000 system (کوربت) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. پیش از بررسی نسبی بیان ژن‌های مورد مطالعه، شرایط تکثیر قطعات توسط روش Real-time PCR برای ژن‌های مورد مطالعه P15 و Dnmt1 و ژن‌های کنترل داخلی Bact و GAPDH از نظر دمای اتصال آغازگرها و انجام بهینه تکثیر، بهینه‌سازی و نرمالیزه شد. توالی آغازگرهای Real-time PCR اختصاصی ژن P15 و Dnmt1 و ژن‌های کنترل داخلی Bact و GAPDH (ایران، ژن فناوران) در جدول آمده است (جداول ۱-۳). در انتها برای محاسبه تغییرات بیان ژن از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ می‌نماییم. مایع رویی را خارج کرده و به محتوای ته لوله ۵۰۰ میکرولیتر PBS اضافه می‌نماییم و مجدداً با همان دور و زمان سانتریفیوژ را تکرار می‌کنیم. سپس استخراج RNA به وسیله کیت و طبق دستورالعمل (آمریکا، کیاژن) صورت گرفت. بر طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA بافر RLT را ۳۵۰ μ L به پلاک سلولی اضافه کرده و مخلوط می‌کنیم. ۳۵۰ μ L الکل ۷۰٪ را به محلول بالا اضافه کرده و آن را مخلوط می‌نماییم و سپس به ستون اضافه می‌کنیم و ستون را در دور ۹۳۰۰ g به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ می‌نماییم. مواد جمع شده میکروتیوب زیر ستون را خارج کرده، یک میکروتیوب دیگر در زیر آن قرار می‌دهیم و به ستون ۵۰۰ μ L از محلول شستشو RPE همراه الکل را اضافه کرده و آن را در دور ۹۳۰۰ g به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ می‌کنیم. در نهایت غلظت RNA در دستگاه نانو دراپ خوانده شد که برحسب نانوگرم بر میکرولیتر به دست آورده شد. ساخت cDNA به وسیله آنزیم نسخه‌بردار معکوس توسط کیت (ایران، YT۴۵۰۰) و با آغازگر اولیگو dT طبق

جدول ۱: توالی آغازگرهای Real-time PCR اختصاصی ژن P15 و Dnmt1 و ژن‌های کنترل داخلی Bact و GAPDH

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه (bp)
GAPDH	GAPDH(R)F	CCACTCCTCCACCTTTGACGCT	۱۵۰
	GAPDH(R)R	TTACTCCTTGGAGGCCATGTGGG	
BACT	BACT(R)F	TGGGGGCCGCGACGATGAG	۲۴۵
	BACT(R)R	GGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG	
P15 (CDKN2B)	CDKN2B(R)F	GATGTGCAAGCGACGACAGA	۸۰
	CDKN2B (R)R	GAGCAAAGGCCAGCATCCT	
Dnmt1	Dnmt1 F	CCTCCAAAACCCAGCCAAC	۱۱۱
	Dnmt1 R	TCCAGGACCCTGGGGTTTC	

جدول ۲: برنامه زمانی دستگاه Real-time PCR جهت انجام PCR با آغازگر ژن Bact و ژن P15

فاز	زمان	دما	چرخه
دنا تورا سیون اولیه	۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد	۱
	۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی گراد	
دنا تورا سیون	۳۰ ثانیه	۵۷ درجه سانتی گراد	۳۵
	۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی گراد	
آنیلینگ			
اکستنشن			

جدول ۳: برنامه زمانی دستگاه Real-time PCR جهت انجام PCR با آغازگر ژن *Bact* و ژن *P15*

فاز	زمان	دما	چرخه
دنا تراسیون اولیه	۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد	۱
دنا تراسیون	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتی گراد	
آنیلینگ	۳۰ ثانیه	۵۸ درجه سانتی گراد	۳۵
اکستنشن	۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی گراد	

 جدول ۴: آغازگرهای متیله و غیر متیله *P15* جهت انجام MSP (Methylation specific PCR)

نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه (bp)
P15 (CDKN2B)	CDKN2B MF	GCGTTCGTATTTTGC GGTT	۱۵۰
	CDKN2B MR	CGTACAATAACCGAACGACCGA	
	CDKN2B UF	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	۱۵۰
	CDKN2B UR	CCATACAATAACCAACAACCAA	

 جدول ۵: برنامه زمانی ترموسایکلر جهت PCR کردن DNA بیسولفیت و کنترل‌های تجاری متیله و غیر متیله کیاژن با آغازگر ژن *P15*

فاز	زمان	دما (درجه سانتی گراد)
دنا تراسیون اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد
دنا تراسیون	۴۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی گراد
آنیلینگ	۴۵ ثانیه	۵۶ درجه سانتی گراد
اکستنشن	۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتی گراد
اکستنشن نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد

استخراج DNA و بررسی متیلاسیون:

سلول‌های کشت داده شده NB4، تحت تاثیر غلظت سلول‌های ۱۵ $\mu\text{g/mL}$ هارمالین در مدت زمان دو روز انکوبه شد و سپس با استفاده از کیت یکتا تجهیز استخراج DNA صورت گرفت. طبق دستورالعمل این کیت ۲۰۰ میکرولیتر *P.B.S* (Phosphat Buffer Saline) را به تکمه سلولی حاصل از سانتریفیوژ اضافه شد و محتویات فالتکون به تیوب ۱/۵ میلی لیتر انتقال داده شد. ۲۰ میکرولیتر از پروتئاز به تیوب ۱/۵ اضافه شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر AL به تیوب اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. آنکوباسیون تیوب در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت و ۲۰۰ میکرولیتر از اتانول ۱۰۰-۹۶ درصد به تیوب اضافه و ۱۵ ثانیه ورتکس شد. محتویات تیوب به ستون‌های استخراج اضافه شد و در ۱۳۴۰۰ g برای

یک دقیقه سانتریفیوژ شد. ستون به تیوب ۲ میلی لیتری استریل انتقال داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر AW1 به ستون اضافه شد و در ۱۳۴۰۰ g برای یک دقیقه سانتریفیوژ شد و مجدداً ستون به تیوب ۲ میلی لیتری استریل انتقال داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر AW2 به ستون اضافه شد و در ۱۶۰۰ g به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد و ستون به تیوب ۲ میلی لیتری استریل انتقال داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر AE به ستون اضافه شد و در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و سپس در ۹۳۰۰ g برای یک دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع خارج شده از ستون به تیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و سپس با استفاده از نانودراپ، غلظت DNA قرائت گردید. DNA استخراج شده با توجه به دستورالعمل کیت اپی تیک بیسولفیت (آمریکا، کیاژن)، بیسولفیت شد. سپس با استفاده

۲۰ ساعت تعداد آن‌ها دو برابر شد.

تاثیر سائیتوتوکسیک هارمالین بر رده سلولی NB4 با استفاده از روش کمی MTT ASSAY:

نتایج حاصل از آزمایش MTT مشخص کرد تاثیر داروی هارمالین بر کاهش پروليفراسيون سلولی به صورت وابسته به دوز و زمان می‌باشد. هارمالین پس از ۴۸ ساعت در غلظت‌های (۱۰ µg/mL، ۱۵ µg/mL، ۲۰ µg/mL، ۲۵ µg/mL و ۳۰ µg/mL) موجب کاهش پروليفراسيون سلول‌ها به ترتيب به صورت ۴۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪ و ۸۰٪ می‌شود ($p < 0.01$) (شکل ۱).

نتایج حاصل از تاثیر دارو بر چرخه سلولی سلول‌های NB4:

با بررسی چرخه سلولی توسط رنگ PI مشخص شد که داروی هارمالین در غلظت (۱۵ µg/mL و ۲۰ µg/mL) باعث توقف سلول‌ها در فاز G0G1 می‌شود ($p < 0.05$). ولی توقف سلول‌ها در فاز G0G1 در مقایسه با غلظت ۲۰ µg/mL نسبت به غلظت ۱۵ µg/mL داروی هارمالین معنادار نمی‌باشد. به همین دلیل برای ادامه کار غلظت

از روش MSP و DNA (۱۰۰ ng)، بیسولفیت به همراه آغازگرهای متیله و یا غیر متیله (۰/۴ µM) و Master PCR 2X (۱۲/۵ µL) به حجم نهایی ۲۵ µL برای تکثیر ژن مورد نظر رسانده شد (جدول ۵) (۶). هم چنین کنترل‌های تجاری متیله و غیر متیله (کیاژن)، که عبارتند از DNA متیله شده و DNA ژنومی، برای بررسی فرآیند MSP استفاده شد و محصول آن‌ها بر روی ژل ۲٪ الکتروفورز بررسی گردید.

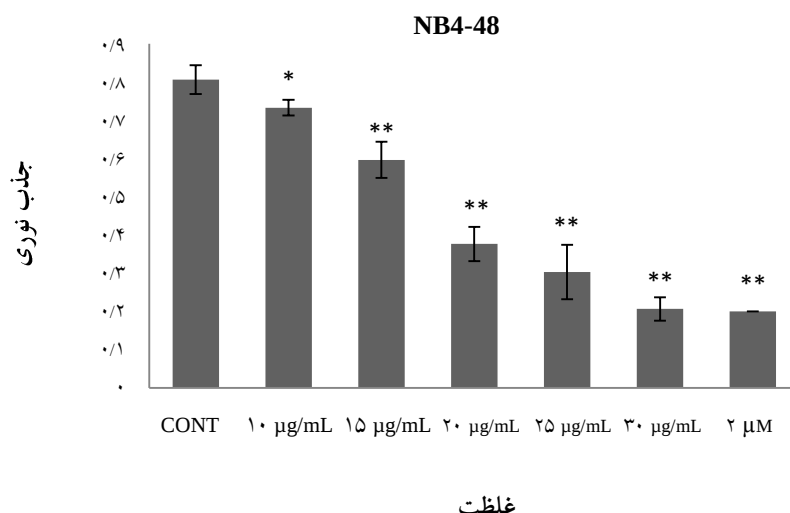
آنالیز آماری:

محاسبه آماری از روش t-test و آزمون Two-Sample Assuming Unequal Variances در نرم‌افزار Excel ۲۰۱۶ استفاده شد.

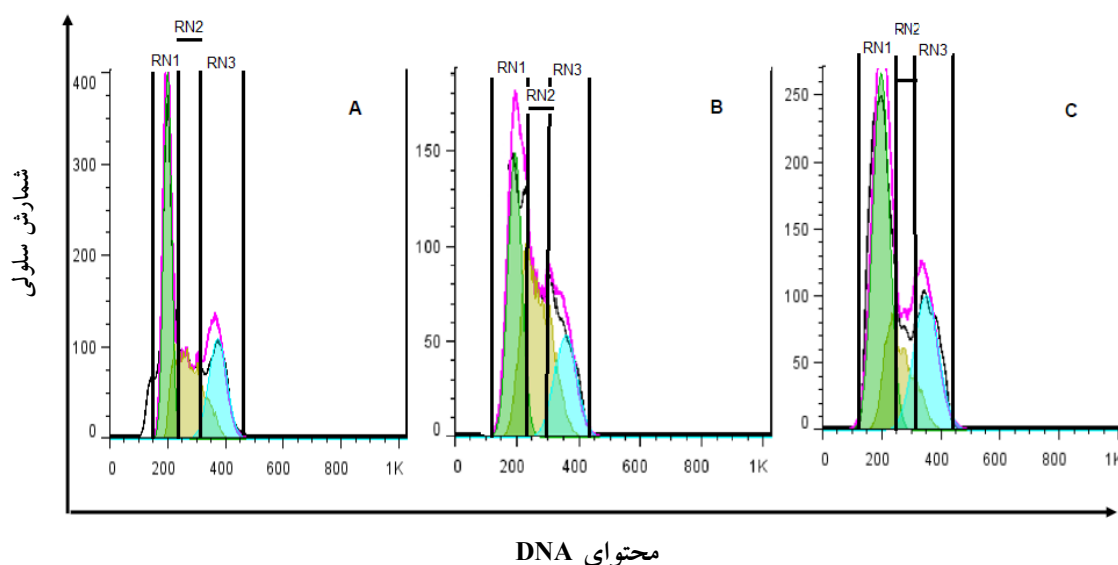
یافته‌ها

نتایج حاصل از رشد و پروليفراسيون رده NB4:

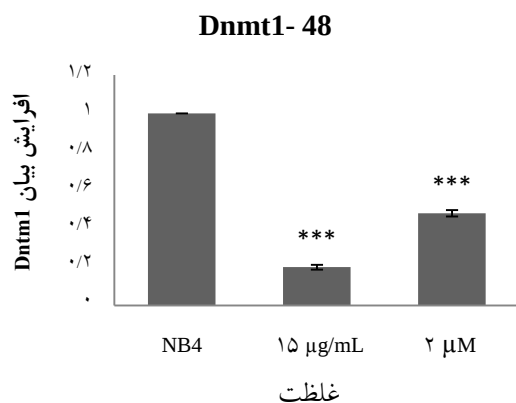
قبل از بررسی تاثیر دارو بر رشد و پروليفراسيون سلولی، ابتدا رشد و پروليفراسيون سلول‌های NB4 به تنهایی و بدون تاثیر دارو در محیط کشت RPMI (FBS ۱۰٪) بررسی شد. رشد این سلول‌ها سریع بوده و در زمان



شکل ۱: نمودار جذب نوری سلول‌های NB4 حاصل آزمایش MTT تحت تاثیر غلظت‌های مختلف داروی هارمالین و 5-آزاسیتیدین (کنترل مثبت، CV = ۰؛ ۲ µM سلول‌های NB4 بدون تاثیر دارو) (کنترل منفی) ($n = 3$ ، $p < 0.05$ (*) و $p < 0.01$ (**)) داده‌های آماری در مقایسه دوزهای مختلف دارو در مقایسه با سلول‌های بدون تاثیر دارو با استفاده از t-Test نشان داده شده است.



شکل ۲: نمودارهای مربوط به فلوسیتومتری با استفاده از رنگ PI جهت بررسی چرخه سلولی، RN1 میزان سلول‌های متوقف شده در فاز G0G1 را نشان می‌دهد، RN2 سلول‌های متوقف شده در فاز S و RN3 سلول‌های متوقف شده در فاز G2M را نشان می‌دهد. تصویر A سلول‌ها NB4 را بدون تاثیر دارو، B سلول‌های NB4 تیمار شده با ۵-آزاسیتیدین (کنترل مثبت، ۲ μM) و C سلول تیمار شده با هارمالین را در دوز ۱۵ μg/mL پس از ۴۸ ساعت نشان می‌دهد.



شکل ۳: نمودار میزان بیان *Dnmt1* در رده سلولی NB4 تحت تاثیر هارمالین و ۵-آزاسیتیدین (کنترل مثبت، غلظت ۲ μM) پس از ۴۸ ساعت (کنترل منفی $n=3$, $cv=0$) ($p<0.001$ (***)). داده‌های آماری در مقایسه دوزهای مختلف دارو با سلول‌های بدون تاثیر دارو (کنترل منفی یا NB4) با استفاده از t -test نشان داده شده است.

و یا سلول‌های غیر تیمار شده NB4 شده است ($n=3$)، $p<0.01$. این افزایش بیان ژن *P15* در غلظت ۱۵ μg/mL هارمالین نسبت به نمونه کنترل مثبت و یا ۵-آزاسیتیدین با غلظت ۲ μM معنادار می‌باشد ($p<0.01$) (شکل ۴).

پایین‌تر هارمالین یعنی ۱۵ μg/mL هارمالین را انتخاب کردیم. داروی ۵-آزاسیتیدین که به عنوان کنترل مثبت تلقی می‌شد در غلظت ۲ μM باعث توقف سلولی در فاز S می‌شود (شکل ۲).

تاثیر هارمالین بر بیان ژن *Dnmt1* با استفاده از Real-time PCR

بیان ژن *Dnmt1* در سلول‌های NB4 تحت تاثیر غلظت ۱۵ μg/mL هارمالین نسبت به سلول‌های NB4 تیمار نشده نمونه کنترل کاهش نشان داده است ($p<0.001$). کاهش بیان ژن *Dnmt1* در غلظت ۱۵ μg/mL هارمالین نسبت به کاهش بیان ایجاد شده در اثر تاثیر ۵-آزاسیتیدین بر سلول‌ها به صورت معناداری بیشتر می‌باشد ($p<0.01$) (شکل ۳).

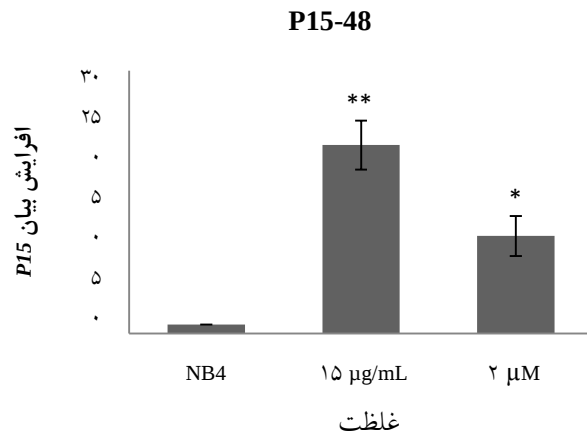
نتایج تاثیر هارمالین بر بیان ژن *P15* با استفاده از Real-time PCR

نتایج تاثیر هارمالین (۱۵ μg/mL) پس از ۴۸ ساعت موجب افزایش بیان ژن *P15* در مقایسه با نمونه کنترل منفی

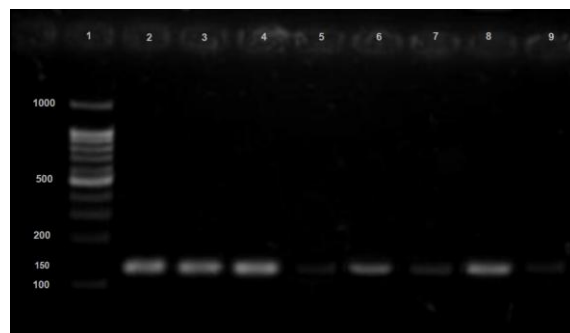
توالی آغازگرها می‌باشد و تکثیر نمونه مورد نظر با هر دو آغازگر M و U نشان دهنده متیلاسیون نسبی است. نتایج نشان داد که پروموتور ژن *P15* رده سلولی NB4، متیله است. هارمالین در غلظت ۱۵ µg/mL موجب هیپومتیله شدن پروموتور ژن *P15* شده است (شکل ۵).

بحث

آلکالوئیدهای مشتق شده از گیاه اسپند دارای خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو بر روی رده‌های سلولی لوسمیک می‌باشد (۷، ۸). در این مطالعه هارمالین که یکی از آلکالوئیدهای مشتق شده از گیاه اسپند است به عنوان یک عامل ضد سرطان و هم چنین عامل مهار کننده متیلاسیون DNA مورد مطالعه قرار گرفته است. هارمالین دارای خاصیت سایتوتوکسیک به صورت وابسته به دوز و زمان می‌باشد که نتایج مشابهی از تاثیر این دارو و سایر داروهای استخراج شده از گیاه اسپند بر روی رده‌های مختلف لوسمیک گزارش شده است (۷، ۹). نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های تیمار شده با هارمالین پس از ۴۸ ساعت در دوز ۱۵ µg/mL باعث توقف سلول‌های لوسمی در فاز G0/G1 می‌شود. در صورتی که داروی ۵-آزاسیتیدین به عنوان کنترل مثبت در غلظت ۲ میکرومولار باعث توقف سلولی در فاز S می‌گردد. نتیجه مشابهی توسط بلوم و همکارانش و منتسا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی ۵-آزاسیتیدین انجام شد که نشان داد ۵-آزاسیتیدین موجب توقف چرخه سلولی در فاز S می‌شوند (۱۱، ۱۰). برونسکی و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی تاثیر پروکانامید پرداختند، که این دارو در غلظت ۵ میکرومولار باعث توقف سلول‌های لوسمی NB4 در فاز G0G1 چرخه سلولی شد. این دارو در غلظت ۵ میکرومولار پروکانامید بیان ژن *Dnmt1* را کاهش می‌دهد (۲). اودی و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی هارمین (یکی دیگر از آلکالوئید گیاهی مشتق شده از گیاه اسپند) و تاثیر دوزهای آنتی‌پرولیفراتیو آن بر رده سلولی لوسمی NB4 پرداختند، هارمین پس از ۷۲ ساعت وابسته به دوز و زمان بوده که در غلظت ۵۱/۲ µg/mL باعث توقف رده سلولی NB4 در فاز چرخه سلول G0G1 شد (۱۲). همسا و همکاران در سال



شکل ۴: میزان بیان ژن *p15* در رده سلولی NB4 تحت تاثیر هارمالین و ۵-آزاسیتیدین (کنترل مثبت) پس از ۴۸ ساعت (کنترل منفی) مقایسه دوزهای مختلف دارو با سلول‌های بدون تاثیر دارو (کنترل منفی) با استفاده از t-test را نشان داده است. $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*), $n = 3$ (cv = 0).



شکل ۵: بررسی محصول MSP بر روی ژل ۲٪. ستون ۱: ladder، ستون ۲: کنترل غیر متیله (U) با آغازگر غیر متیله *P15*، ستون ۳: کنترل متیله با آغازگر متیله *P15* (M)، ستون ۴: NB4 غیر تیمار شده با آغازگر متیله، ستون ۵: نمونه غیر تیمار شده NB4 با آغازگر غیر متیله، ستون ۶: NB4 تیمار شده با ۵-آزاسیتیدین با آغازگر غیر متیله، ستون ۷: NB4 تیمار شده با ۵-آزاسیتیدین با آغازگر متیله، ستون ۸: NB4 تیمار شده با هارمالین با آغازگر غیر متیله، ستون ۹: NB4 تیمار شده با هارمالین با آغازگر متیله.

ارزیابی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن *P15*:

تکثیر با آغازگر متیله (M) نشان‌دهنده متیلاسیون نواحی CpG درون توالی آغازگرها و تکثیر با آغازگر غیرمتیله (U) نشان‌دهنده عدم وجود متیلاسیون در نواحی CpG درون

gallat) در غلظت $30 \mu\text{g/mL}$ موجب هیپومتیله شدن پروموتور ژن‌های *P16*، *TSG1* و *P73* در سلول‌های Jurkat و افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود (۱۶). با توجه به گزارش‌های ارائه شده هارمالین در مقایسه با سایر داروهای طبیعی مانند کورکامین، پلی‌فنل چای سبز (EGCG)، ماهانین و هارمین در غلظت پایین‌تر، اثر بخشی بیشتری بر روی هیپومتیلاسیون پروموتور ژن سلول لوسمی دارد (۱۷).

نتیجه‌گیری

با توجه به هیپرمیتلاسیون ژن‌های سرکوب‌کننده تومور در بیماران APL و هم چنین اثر بخشی داروی هارمالین در القای اثرات سیتوتوکسیک در سلول‌های پرومیلوسیتیک NB4 و هم چنین کاهش بیان *Dnmt1* و تاثیر آن بر هیپومتیلاسیون ژن *P15* که موجب افزایش بیان ژن *P15* در این رده سلولی می‌شود، می‌توان چنین پیشنهاد داد که این دارو می‌تواند به عنوان یک راه‌کار درمانی مناسب چه به صورت مونوتراپی و چه به صورت داروی مکمل همراه با داروهای متداول APL مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات می‌باشد. بدین وسیله از مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون و خانم دکتر آقایی قدردانی می‌نمایم. هم چنین شایسته است از آقای دکتر امیری‌زاده و خانم دکتر محمدی‌پور که در این راه از راهنمایی ایشان بهره‌مند شده‌ام بسیار تشکر نمایم. از همکاری بیمارستان شریعتی و خانم دکتر رستمی نیز تشکر می‌نمایم.

۲۰۱۱ نتایج مشابهی از تاثیر هارمین در غلظت‌های پایین هارمین به دست آوردند (۱۳). هارمالین از غلظت $5 \mu\text{g/mL}$ موجب کاهش بیان ژن *Dnmt1* و هیپومتیلاسیون در پروموتور ژن *P15* می‌شود. با توجه به هیپومتیلاسیون در پروموتور ژن *P15* انتظار می‌رود بیان ژن *P15* افزایش پیدا کند و بررسی تاثیر دوزهای آنتی‌پرولیفراتیو هارمالین بر بیان ژن *P15* در رده سلولی NB4 نشان داد که هارمالین در غلظت $5 \mu\text{g/mL}$ موجب افزایش ۱۹ برابری بیان ژن *P15* می‌گردد. اودی و همکاران در بررسی هارمین بر روی سلول‌های لوسمی NB4 در غلظت $25/6 \mu\text{g/mL}$ موجب کاهش بیان *Dnmt1* mRNA ۵۸٪ و در غلظت $51/2 \mu\text{g/mL}$ موجب کاهش ۶۵٪ در بیان ژن *Dnmt1* می‌شود. که این کاهش باعث هیپومتیله شدن پروموتور *P15* گردیده و این امر باعث افزایش بیان *P15* شده است. علاوه بر هارمین و هارمالین، ترکیبات دیگری از گیاهان باعث تاثیر در هیپومتیلاسیون سلول‌های لوسمی می‌شوند. جیان هو و همکارانش در سال ۲۰۱۳ به بررسی متیلاسیون پروموتور ژن *P15* پرداختند و بررسی‌های آن‌ها نشان داد که کورکامین ($36 \mu\text{g/mL}$) موجب توقف سلول‌های NB4 در فاز G1 چرخه سلولی و هم چنین کاهش متیلاسیون پروموتور ژن *P15* و متعاقب آن، افزایش ۵ برابری در بیان ژن *P15* می‌شود (۱۴). حسن حمزه و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر کورکومین و دی‌متوکسی کورکومین پرداختند، که نتایج بررسی نشان داد این دو دارو تاثیر سیتوتوکسیک و هیپومتیلاسیون پروموتور بر رده سلول لوسمی را نداشته، اما از مسیری دیگر بیان پروموتور ژن *P15* را افزایش می‌دهند (۱۵). هم چنین اکوار و همکارانشان در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که EGCG (Epigallocatechin-3-) سال

References:

- Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Mol Oncol* 2007; 1(1): 26-41.
- Borutinskaite V, Bauraitė-Akatova J, Navakauskiene R. Anti-leukemic activity of DNA methyltransferase inhibitor procaine targeted on human leukaemia cells. *Open Life Sciences* 2016; 11(1): 322-30.
- De Braekeleer M, Douet-Guilbert N, De Braekeleer E. Prognostic impact of *p15* gene aberrations in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 2017; 58(2): 257-65.
- Bodoor K, Haddad Y, Alkhateeb A, Al-Abbadi A, Dowairi M, Magableh A, et al. DNA hypermethylation of cell cycle (*p15* and *p16*) and apoptotic (*p14*, *p53*, *DAPK* and *TMS1*) genes in peripheral blood of leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(1): 75-84.
- Ren J, Singh BN, Huang Q, Li Z, Gao Y, Mishra P, et al. DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal* 2011; 23(7): 1082-93.
- Amirizadeh N, Oodi A, Nikougoftar M, Soltanpour

- MS. Expression and promoter methylation changes of the P15INK4b during *ex vivo* cord blood CD34+ cell expansion following co-culture with mesenchymal stromal cells. *Hematology* 2013; 18(5): 260-8.
- 7- Zaker F, Oody A, Arjmand A. A study on the antitumoral and differentiation effects of Peganum harmala derivatives in combination with ATRA on leukaemic cells. *Arch Pharm Res* 2007; 30(7): 844-9.
 - 8- Oodi A, Norouzi H, Amirzadeh N, Nikougoftar M, Vafaie Z. Harmine, a Novel DNA Methyltransferase 1 Inhibitor in the Leukemia Cell Line. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2017; 33(4): 509-15.
 - 9- Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, Jahani S. Evaluation of anti-cancer effect of Peganum harmala L hydroalcoholic extract on human cervical carcinoma epithelial cell line. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16(4): 1-8. [Article in Farsi]
 - 10- Blum W, Marcucci G. Targeting epigenetic changes in acute myeloid leukemia. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O* 2005; 3(11): 855-65, 82.
 - 11- Montesano A, Luzi L, Senesi P, Terruzzi I. Modulation of cell cycle progression by 5-azacytidine is associated with early myogenesis induction in murine myoblasts. *Int J Biol Sci* 2013; 9(4): 391-402.
 - 12- Hamsa TP, Kuttan G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chin Med* 2011; 6(1): 11.
 - 13- Yu J, Peng Y, Wu LC, Xie Z, Deng Y, Hughes T, *et al.* Curcumin down-regulates DNA methyltransferase 1 and plays an anti-leukemic role in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2013; 8(2): e55934.
 - 14- Hassan HE, Carlson S, Abdallah I, Buttolph T, Glass KC, Fandy TE. Curcumin and dimethoxycurcumin induced epigenetic changes in leukemia cells. *Pharm Res* 2015; 32(3): 863-75.
 - 15- Achour M, Mousli M, Alhosin M, Ibrahim A, Peluso J, Muller CD, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate up-regulates tumor suppressor gene expression via a reactive oxygen species-dependent down-regulation of UHRF1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(1): 208-12.
 - 16- Agarwal S, Amin KS, Jagadeesh S, Baishay G, Rao PG, Barua NC, *et al.* Mahanine restores RASSF1A expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2013; 12(1): 99.

Original Article

Effect of harmalin on *Dnmt1* expression and hypomethylation of *P15* gene promoter in NB4 leukemic cell

Nikkhoo P.¹, Oodi A.¹, Sotoodehnejadmatalahi F.²

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Department of Biology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

One of the most important mechanisms of hematologic malignancies is DNA methylation in the promoter region of tumor suppressor genes such as *P15*. Harmalin is one of the alkaloids derived from plants that show anti-proliferative activity on leukemic cell lines. The effect of harmalin on *Dnmt1* gene expression and hypomethylation of *P15* promoter in NB4 cell line was evaluated.

Materials and Methods

In this experimental study, cytotoxic effects of harmaline were investigated until 72 hours on the NB4 cell line using MTT. Flow cytometry was performed in order to evaluate the cell cycle of NB4 cell line after treatment with harmalin. Gene promoter methylation status of *P15* was evaluated by Methylation Specific PCR. *Dnmt1* and *P15* gene expression was analyzed by Real-time PCR technique.

Results

15µg/ml harmalin after 48 hours showed a dose and time-dependent anti-proliferative properties on NB4 cell line, cell cycle analysis would stop NB4 cells in G0G1 phase of the cell cycle. Real-time PCR results showed that 15µg/ml harmalin reduced gene expression of *Dnmt1*, induced hypomethylation of *P15* gene promoter and increased *P15* gene expression in NB4 cell line.

Conclusions

According to our data, the effect of harmalin on reduction of *Dnmt1* expression, *P15* promoter hypomethylation and *P15* reactivation in this cell line showed that it could be suggested as a therapeutic strategy, suitable for monotherapy or supplement for medication which is commonly used for APL (Acute Promyeloid Leukemia).

Key words: Methylation, Gene, Leukemia

Received: 13 Jun 2017

Accepted: 20 Aug 2017

Correspondence: Oodi A., PhD of Hematology and Blood Banking. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601599; Fax : (+9821) 88601599
E-mail: ar.oodi@gmail.com