

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

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، آزمایش MTT برای بررسی اثر آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید بر مهار رشد سلول‌های KG-1 و U937 استفاده شد. دوزهای آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید به 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 *ANOVA*، *student-t test* 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 $1/618 \mu\text{M}$ و $1 \mu\text{M}$ و دوز انتخابی تالیدوماید در رده سلولی KG-1 و U937 به ترتیب برابر با $80 \mu\text{M}$ و $60 \mu\text{M}$ 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.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن *VEGF A* در رده سلولی KG-1 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، تالیدوماید، لوسمی میلوئیدی حاد

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱

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

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 (۳، ۴). 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 (۵، ۶). 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 تری‌اکسید و دسترسی به افزایش اثرات شیمی‌درمانی، روش‌های درمانی به صورت استفاده ترکیبی از داروهایی که مکانیسم مشابهی 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 (۱۰، ۱۱). تولید و تولید دارای خواص ایمونومودولاتوری، ضد التهابی و آنتی‌آنژیوتیک

می‌باشد. تولید و تولید در سال ۱۹۵۶ اولین بار در آلمان تولید شد و به عنوان داروی بی‌خواهی 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 ایتگرین به علت اثر سرکوب‌کنندگی بر $\text{INF-}\gamma$ ، $\text{TNF-}\alpha$ 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 تومورژنیستی 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 تومورژنیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور معمول درمان AML (7+3) شامل ترکیبی از cytarabine 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 بر آن شدیم که برای اولین بار به ارزیابی اثر ترکیبی دو داروی آرسنیک تری‌اکسید و تولید و تولید 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 سل‌ل‌های مقاوم و حساس

به داروهای متداول شیمی درمانی AML بپردازیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. دو رده سلولی KG-1 و U937 در محیط RPMI1640 با ۱۰٪ سرم گاوی (Fetal Bovin Serum) برای U937 و ۲۰٪ سرم گاوی برای KG-1، همراه با ۱۰۰ U/mL پنی سیلین و ۱۰۰ استرپتومایسین کشت و نگهداری می‌شود. سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت و ۵٪ دی اکسید کربن، انکوبه خواهند شد.

Microculture Tetrazolium Test (MTT):

برای اندازه‌گیری اثر مهارت تالیدوماید (سانتاکروز) و آرسنیک تری اکساید (سینا دارو) بر روی فعالیت متابولیکی سلول‌های U937 و KG-1 به روش MTT Assay [برای ساخت محلول MTT، ۵ میلی گرم پودر MTT را در ۱ میلی لیتر محیط RPMI 1640 بدون FBS حل کرده (این پودر به سختی حل می‌شود) تا محلول ۵ mg/mL ساخته شود. سپس با محیط RPMI آن را به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده تا استوک ۰/۵ mg/mL ساخته شود (این محلول به صورت تازه استفاده می‌شود)]. در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از پودر MTT (مشتق از نمک‌های تiazol) و محلول DMSO (دی متیل سولفواکساید) استفاده خواهد شد. محلول MTT (۰/۵ mg/mL) به مقدار ۵۰ میکرولیتر به سلول‌ها اضافه می‌شود و سلول‌ها به مدت چهار ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه خواهند شد تا این محلول را متابولیزه کنند. رسوب فرمازان تشکیل شده با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل خواهد شد و محلول بنفش رنگی

ایجاد می‌شود. این مراحل باید به سرعت انجام گیرد (بین ۱ تا ۲ دقیقه بعد از ریختن محلول DMSO، سلول‌ها باید در دستگاه ELISA Reader قرار بگیرند) زیرا DMSO در صورت تماس طولانی مدت با سلول‌ها برای آن‌ها سمی است و سپس جذب نوری با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۸ نانومتر خوانده خواهد شد. سلول‌ها با غلظت‌های ۵-۱۰۰ μmol تالیدوماید و ۰/۴-۵ μmol آرسنیک به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار می‌شوند.

سنجش میزان آپوپتوز سلولی به روش فلوسیتومتری:

بدین منظور ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار نمودن رده‌های سلولی KG-1 و U937 توسط آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید و نیز ترکیب آرسنیک تری اکساید با تالیدوماید که در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شده بودند، با استفاده از کیت رنگی دوگانه Annexin/PI سلول‌ها جهت بررسی میزان آپوپتوز رنگ آمیزی شدند. در این روش سلول‌های تیمار شده با بافر شسته شد و سوسپانسیون سلولی تهیه گردید (۱۰^۶ × ۱ در هر میلی لیتر). ابتدا سلول‌ها جمع‌آوری شده و با دور ۶۰۰ G در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سلول‌ها ۱ بار توسط PBS 1X شسته شدند. به هر لوله ۱۰۰ میکرو لیتر از Binding buffer 1X که به آن ۱ میکرو لیتر از رنگ آنکسین با غلظت استوک ۰/۵ mg/mL و ۱ μL از PI با غلظت استوک ۰/۱ mg/mL اضافه شده بود، افزوده و لوله‌ها به آرامی و رتکس شدند. لوله‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند و سپس بلافاصله توسط فلوسیتومتری آنالیز شدند. نتایج دستگاه فلوسیتومتری توسط نرم‌افزار FlowJO با version (7.6.1) تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: توالی آغازگرهای جلو برنده و معکوس

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

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

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

برای اندازه‌گیری غلظت RNA نمونه‌ها از دستگاه نانو
دراپ (آلمان، NanoDrop) استفاده گردید. با استفاده از
کیت cDNA ستاز (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 میکرو لیتر
cDNA، ۱ میکرو لیتر آغازگر معکوس و ۱ میکرو لیتر
آغازگر جلو برنده (۱۰ پیکومول) و ۶ میکرو لیتر 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 مدت ۲۰ 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
جلو برنده و معکوس بود. اختصاصیت تمامی آغازگرها با
نرم‌افزار آنالین Primer-BLAST (وب سایت NCBI) 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 به Drug 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:

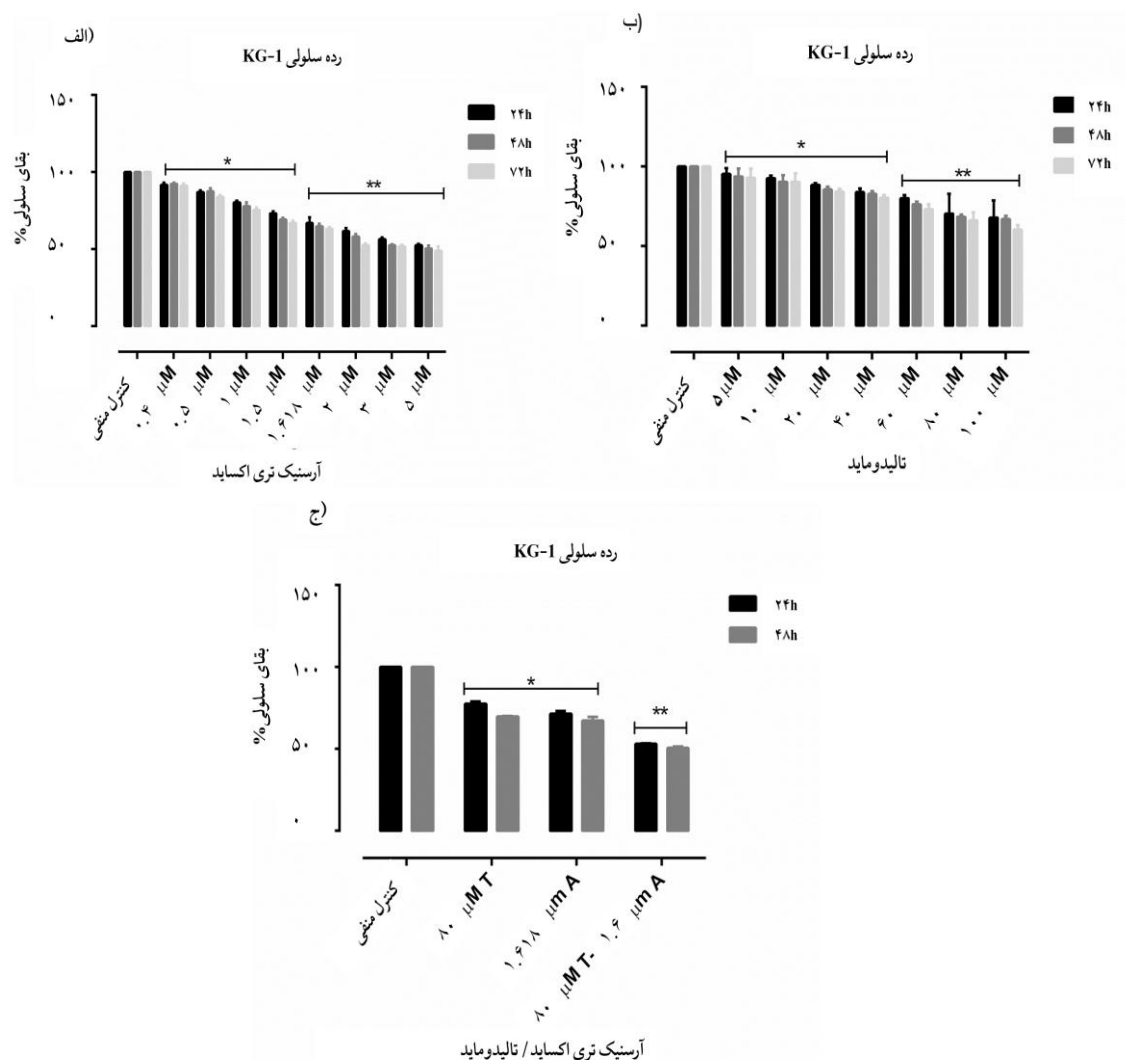
نتایج حاکی از آن است که در رده سلولی U937 اثر
آرسنیک تری‌اکساید در دوزهای ۱ تا ۵ میکرومولار و اثر
تالیدوماید در دوزهای ۶۰ تا ۱۰۰ میکرومولار قابل توجه
بوده است (نمودار ۲). هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو
نشان می‌دهد ۱ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید و ۶۰
میکرومولار تالیدوماید می‌توانند کشندگی بیشتری به دنبال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

همان‌طور 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.

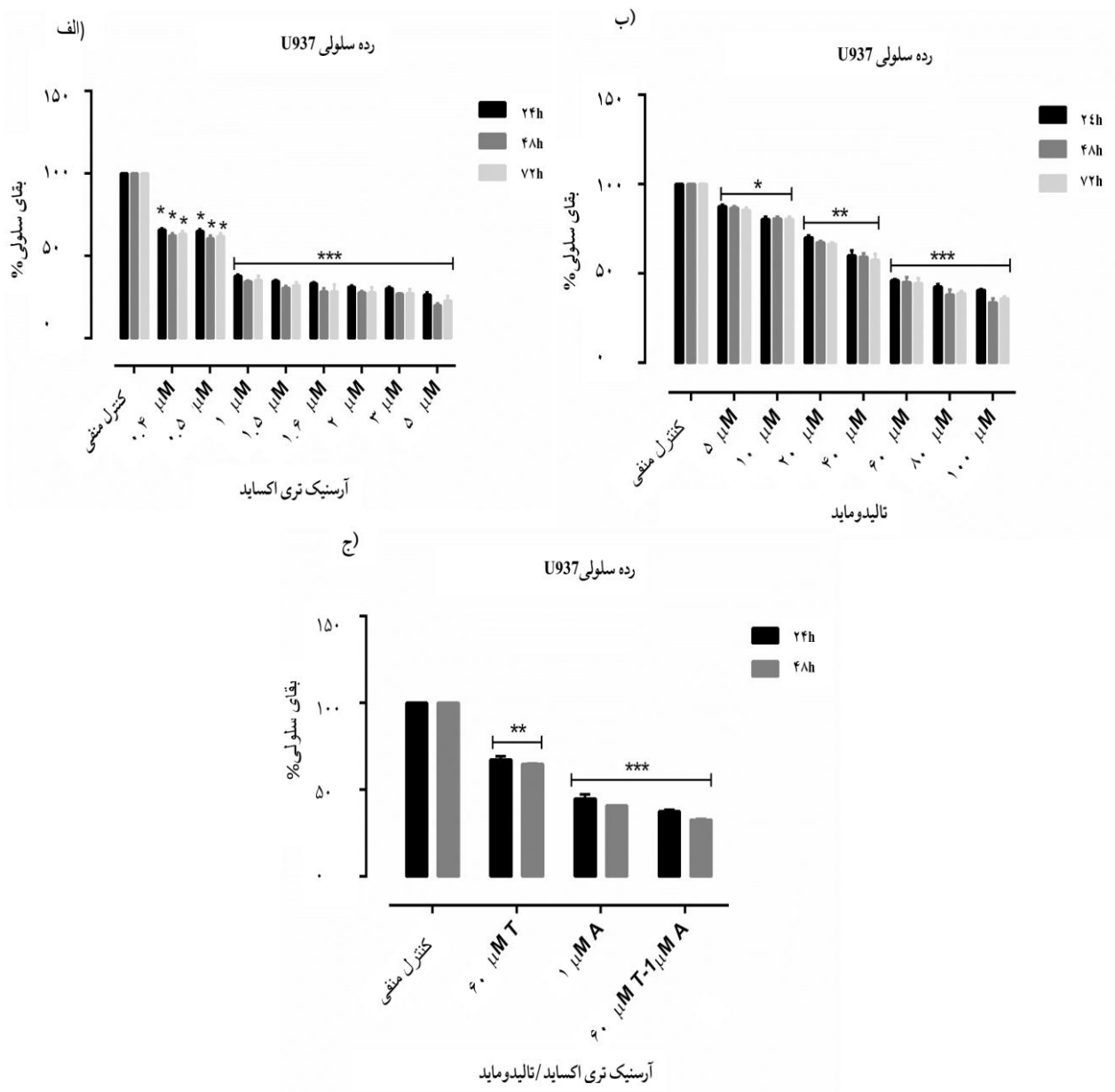
در ادامه جهت تأیید نتایج بقا حاصل از آزمایش MTT،
به منظور ارزیابی اثر القایی آرسنیک تری‌اکساید به تنهایی
یا در ترکیب با تالیدوماید بر فعالیت کشندگی و مهار رشد
سلولی و مشخص شدن این که این اثر با واسطه آپوپتوز و
یا با واسطه نکروز سلولی است، رنگ آمیزی Annexin/PI
انجام شد و درصد سلول‌های آپوپتوتیک تعیین 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 ساعته
صورت گرفت.

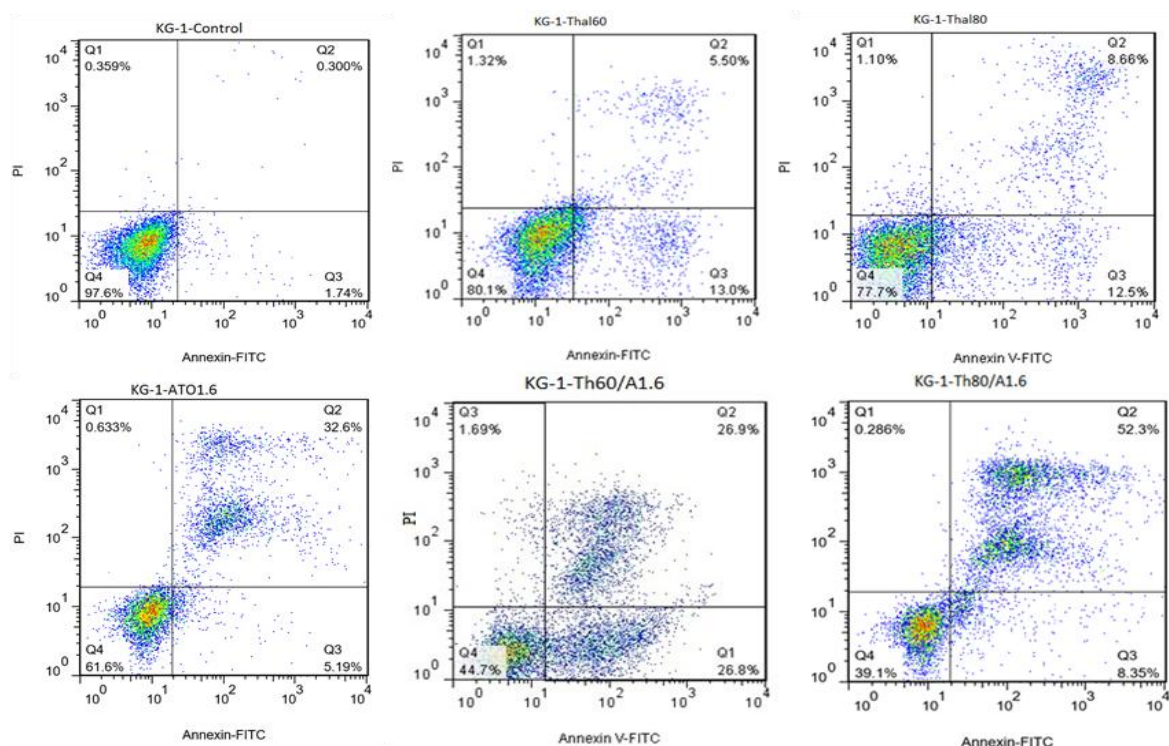
در این آزمایش تنها جمعیت‌هایی که Annexin⁺ و یا
Annexin⁺/PI⁺ باشند حائز اهمیت بوده و جمعیت‌های PI⁺
به تنهایی حاکی از نکروز سلولی بوده که فاقد اهمیت
می‌باشند (شکل‌های ۱ و ۲).



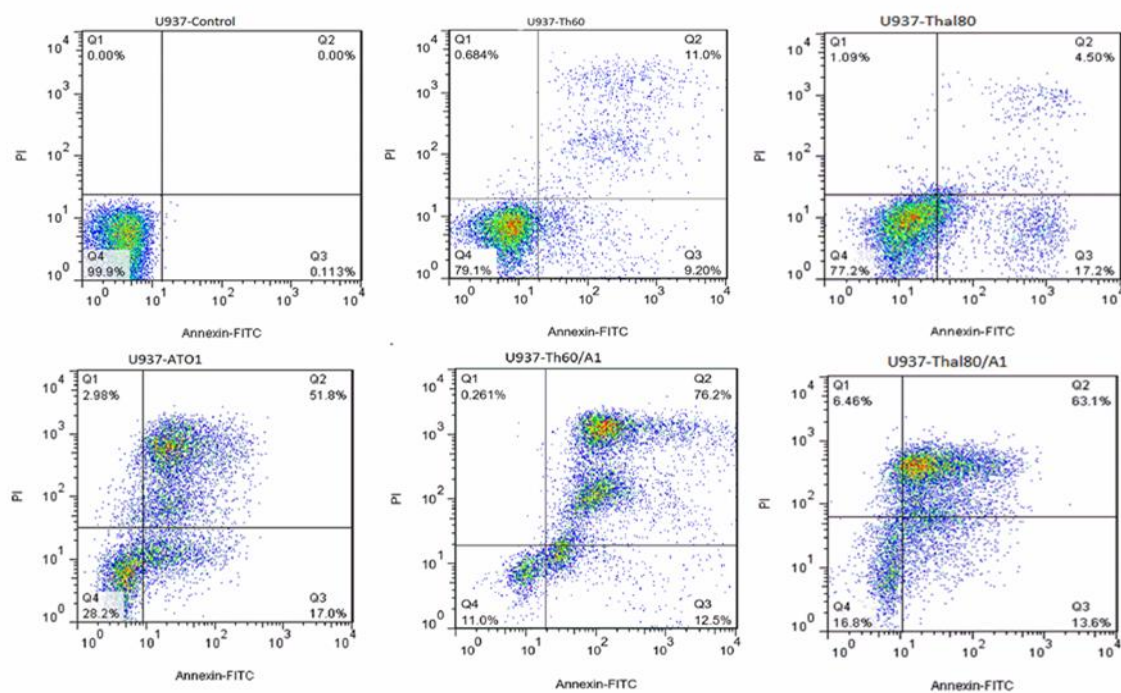
نمودار ۱: A) نمودار ستونی اثر مهار غلظت‌های مختلف ($0.4-5 \mu\text{M}$) آرسنیک تری اکساید بر رشد سلول‌ها و بقا. B) نمودار ستونی اثر مهار غلظت‌های مختلف ($5-100 \mu\text{M}$) تالیدوماید بر رشد سلول‌ها و بقا. C) نمودار ستونی اثر مهار غلظت‌های مختلف آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید و همچنین اثر ترکیبی آن‌ها 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 $SD \pm \text{mean}$ نمایش داده شده و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ ** تعریف شده است.



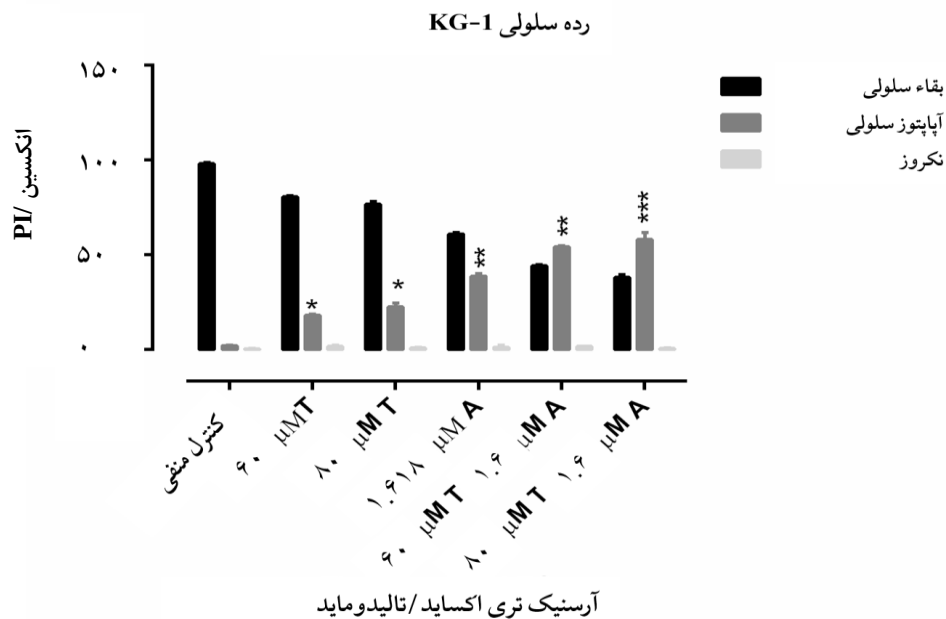
نمودار ۲: A) نمودار ستونی اثر مهار غلظت‌های مختلف (۴-۵۰ μM) آرسنیک تری اکساید بر رشد سلول‌ها و بقا. B) نمودار ستونی اثر مهار غلظت‌های مختلف (۵-۱۰۰ μM) تالیدوماید بر رشد سلول‌ها و بقا. C) نمودار ستونی اثر مهار غلظت‌های مختلف آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید و هم چنین اثر ترکیبی آن‌ها بر رشد سلول‌ها و بقا. رده سلولی U937 در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT. با سه بار تکرار به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ تعریف شده است.



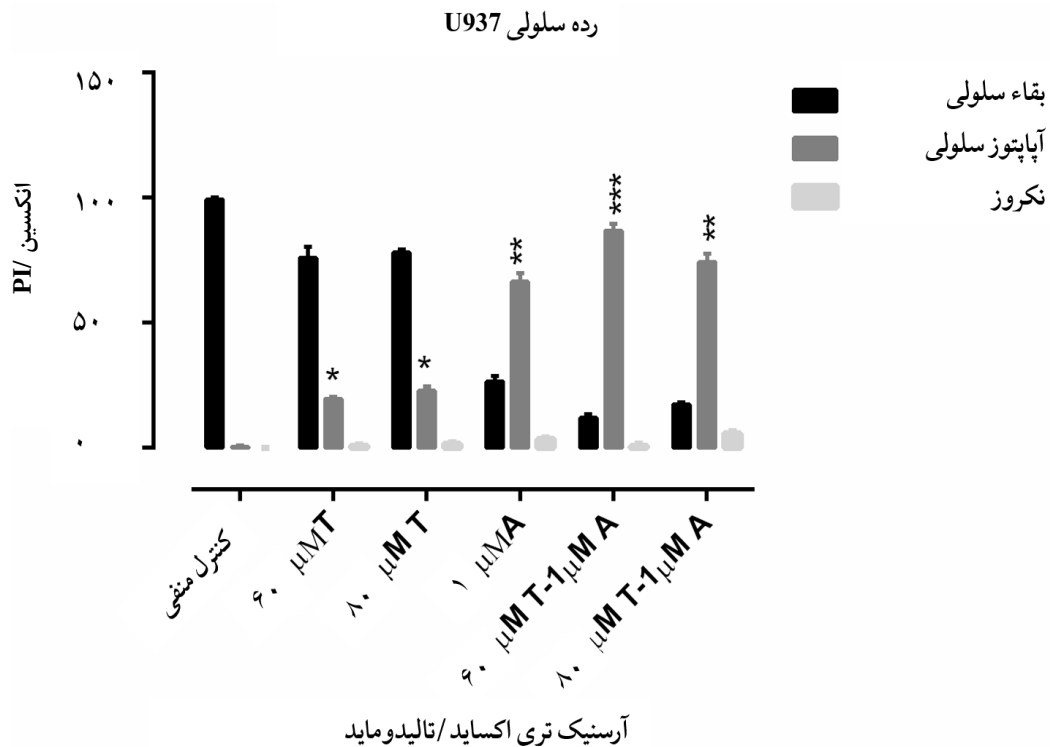
شکل ۱: بررسی آپوپتوز با داروهای آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید بر روی KG-1



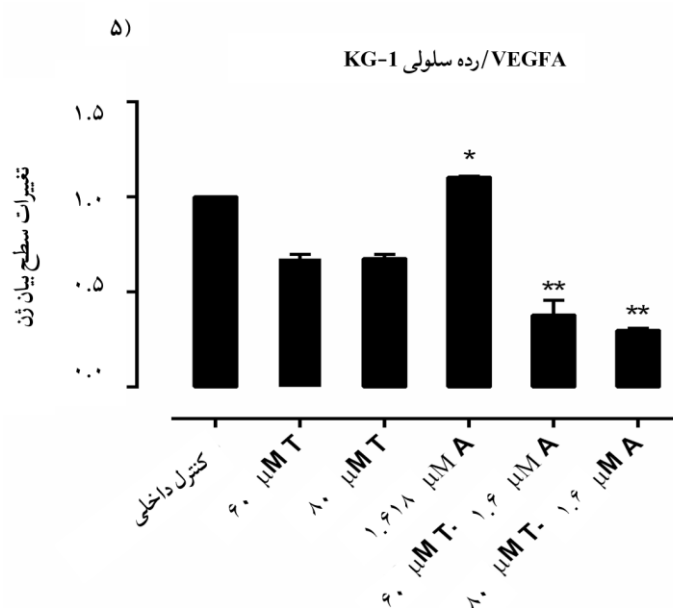
شکل ۲: بررسی آپوپتوز با داروهای آرسنیک تری اکساید و تالیدوماید بر روی U937



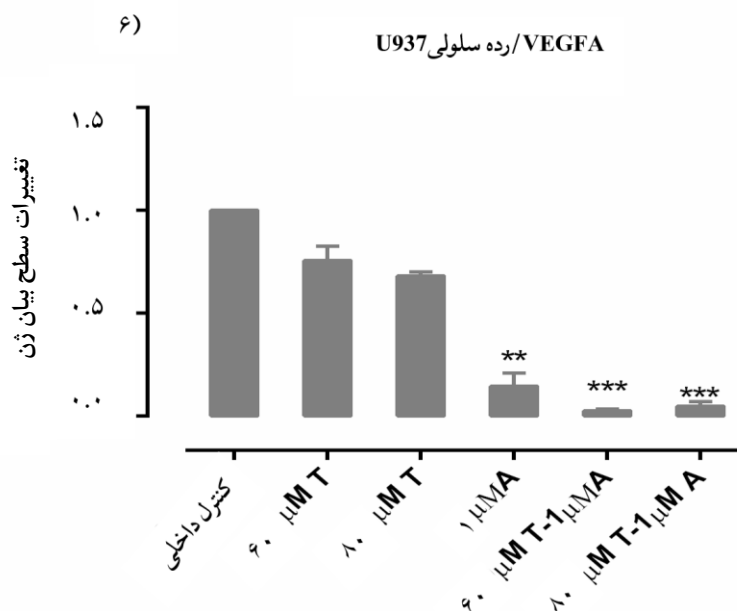
نمودار ۳: نتایج بررسی آپتوز سلولی حاصل از رنگ آمیزی Annexin/PI در رده سلولی KG-1 در بازه زمانی ۴۸ ساعت به دنبال تیمار سازی با غلظت‌های (۱/۶۱۸ μM) آرسنیک تری اکساید و غلظت (۶۰ و ۸۰ μM) تالیدوماید و مقادیر ترکیبی آن‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار ۴: نتایج بررسی آپتوز سلولی حاصل از رنگ آمیزی Annexin/PI در رده سلولی U937 در بازه زمانی ۴۸ ساعت به دنبال تیمار سازی با غلظت‌های (۱ μM) آرسنیک تری اکساید و غلظت (۶۰ و ۸۰ μM) تالیدوماید و مقادیر ترکیبی آن‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار ۵: نتایج تیمار سلول‌ها با آرسنیک تری اکساید ($1/618 \mu\text{M}$) و تالیدوماید ($60 \mu\text{M}$ و $80 \mu\text{M}$) و ترکیب آرسنیک و تالیدوماید بر روی بیان VEGF A. در یک بازه زمانی ۴۸ ساعته. نمونه‌ها با سه بار تکرار به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/001$ *** تعریف شده است.



نمودار ۶: نتایج تیمار سلول‌ها با آرسنیک تری اکساید ($1 \mu\text{M}$) و تالیدوماید ($60 \mu\text{M}$ و $80 \mu\text{M}$) و ترکیب آرسنیک و تالیدوماید بر روی بیان VEGF A. در یک بازه زمانی ۴۸ ساعته. نمونه‌ها با سه بار تکرار به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شده‌اند و تفاوت آماری معنادار در مقایسه با گروه کنترل به صورت $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/001$ *** تعریف شده است.

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 تالیدوماید، یک افزایش آپوپتوتیک قابل توجهی را نسبت به دوزهای آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید به تنهایی، نشان می‌دهد (نمودارهای ۳ و ۴).

نتایج بررسی اثر آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید بر روی بیان ژن *VEGF A* در سطح *mRNA* در رده‌ی سلولی *KG-1*:

نتایج بررسی میزان بیان ژن *VEGF A* در رده سلولی *KG-1* نشان می‌دهد میزان بیان در دوزهای ۶۰ و ۸۰ میکرومولار تالیدوماید کاهش و در دوز ۱/۶۱۸ آرسنیک تری‌اکساید افزایشی بوده و هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو میزان بیان را به نسبت کنترل کاهش می‌دهد، این کاهش بیان در دوز ۸۰ میکرومولار تالیدوماید و ۱/۶۱۸ آرسنیک تری‌اکساید بیشتر نشان داده شده است (نمودار ۵).

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

نتایج بررسی میزان بیان ژن *VEGF A* در رده سلولی *U937* نشان می‌دهد میزان بیان در دوزهای ۶۰ و ۸۰ میکرومولار تالیدوماید کاهش و در دوز ۱ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید نیز کاهش یافته و هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو میزان بیان را به نسبت کنترل کاهش می‌دهد، این کاهش بیان در دوز ۶۰ میکرومولار تالیدوماید و ۱ آرسنیک تری‌اکساید بیشتر نشان داده شده است (نمودار ۶).

بحث

لوسمی میلوئیدی حاد یکی از شایع‌ترین اختلالات هماتولوژیک است. اگر چه بیش از ۸۰ درصد بیماران مبتلا به AML با داروهای رایج امروزی به مرحله خاموشی کامل می‌رسند، ولی میزان بقای ۵ ساله تنها بین ۴۰-۵۰ درصد می‌باشد و شانس بقای طولانی مدت

بسیار پائین است، که این خود حاکی از ناکارآمد بودن درمان‌های رایج می‌باشد (۱۵). داروها با اساس آرسنیک به عنوان عوامل شیمی‌درمانی مؤثر برای درمان بیماری‌های مختلف و برخی از تومورها استفاده شده است (۱۴). در مطالعه‌ها نشان داده شده که این ترکیب سبب توقف چرخه سلولی و القای آپپتوز در سلول‌های APL و non-APL می‌شود. بنابراین تصمیم گرفتیم برای اولین بار به ارزیابی اثر ترکیبی تالیدوماید و آرسنیک تری‌اکساید بر روی بیان ژن *VEGF A* در سل‌لین‌های *U937* و *KG-1* پردازیم.

در این مطالعه ارزیابی اولیه توسط MTT به منظور تعیین اثرات توکسیک آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید در بازه زمانی مختلف در دو رده‌ی سلولی *KG-1* و *U937* صورت گرفت. دوز انتخابی توسط این آزمایش ۱/۶۱۸ میکرومولار برای آرسنیک تری‌اکساید و ۶۰ و ۸۰ میکرومولار برای تالیدوماید و هم چنین دوز ترکیبی (۸۰ μ MT- μ MA-۱/۶۱۸) برای رده‌ی سلولی *KG-1* در نظر گرفته شد. هم چنین دوزهای انتخابی توسط آزمایش ۱ μ M برای آرسنیک تری‌اکساید و ۶۰ و ۸۰ μ M برای تالیدوماید در رده سلولی *U937* در نظر گرفته شد. هم چنین دوز ترکیبی (۱ μ M A-۶۰ μ M T) برای رده‌ی سلولی *U937* در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان آپپتوز و نکروز توسط این دوزها، آزمایش فلوسایتمتری انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که این دوزهای آرسنیک و تالیدوماید و اثر ترکیبی آن‌ها قادر به القای درصد قابل توجهی از آپپتوز می‌باشد. علاوه بر آن که مطالعه‌های گذشته بیانگر آن هستند که دوز استاندارد برای القای آپپتوز توسط آرسنیک تری‌اکساید در محدوده غلظتی ۲-۵/۰ میکرومولار است. بنابراین دوزهای اصلی برای این مطالعه برای آرسنیک ۱/۶۱۸ میکرومولار و ۱ میکرومولار به ترتیب در رده سلولی *KG-1* و *U937* انتخاب شد. بر اساس نتایج حاضر، آرسنیک تری‌اکساید و تالیدوماید در مهار رشد و القای آپپتوز در رده سلولی *KG-1* و *U937* به صورت وابسته به دوز و زمان عمل کرده است.

در مطالعه‌ها مشخص شده است که *VEGF (VEGF A)* فاکتور رشد اختصاصی برای آنژیوژنز می‌باشد. *VEGF*

چندین نوع از تومورها تحت ارزیابی قرار گرفته است، مثل بدخیمی های هماتولوژیک، میلوم مالتیپل و تومورهای جامد. در این مطالعه ها نشان داده شده است که تالیدوماید موجب کاهش بیان عوامل مؤثر در رگ زایی می شود (۲۴-۲۰).

استینز و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مطالعه خود نتایج مشابهی را گزارش کردند که تالیدوماید با پایین آوردن سطح *FGF-2* و *VEGF* باعث آنتی آنژیوژنز می شوند (۲۵). روبرو در سال ۲۰۰۰ نشان داد که آرسنیک تری اکساید با مهار *VEGF* منجر به القای آپوپتوز در لوسمی می شود. هم چنین آن ها نشان دادند که این دارو *PML/RAR-α* را تخریب می کند (۱۸).

چن و همکارانش با بررسی هایی بر روی *NB4* و آرسنیک تری اکساید افزایش آپوپتوز را به واسطه کنترل کردن *bcl-2* و *PML/RAR-α* نشان دادند (۲۶). یانگ و همکارانش در مطالعه ای بر روی سرطان ریه در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که آرسنیک تری اکساید با مهار فاکتورهای *HIF-1α*، *VEGFR-2*، *VEGF-A* و *Notch-1* مسیر آنژیوژنز را مهار می کند (۲۷).

نتیجه گیری

اثر ترکیبی این دارو سبب افزایش آپوپتوز سلولی و کاهش میزان بیان ژن اصلی در رگ زایی (*VEGF A*) می شود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و نتایج مطالعه های گذشته این دو دارو به صورت ترکیبی می توانند اثرات مؤثری در درمان سرطان خون ایفا کنند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات هماتولوژی، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی به خاطر تأمین بودجه طرح قدردانی می گردد.

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 human acute 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*

ترشح شده توسط سلول لوسمی با گیرنده های مربوطه در سطح سلول های اندوتلیال در ارتباط است و سلول های اندوتلیال را برای تولید فاکتورهای رشد که بر روی سلول های لوسمیک قرار دارند؛ تحریک می کند در نتیجه فعالیت تکثری و مقاومت دارویی افزایش می یابد (۱۶). بنابراین درمان ضد آنژیوژنز بر اساس مهار فعالیت فیزیولوژیکی *VEGF* یک استراتژی جدید برای درمان هدفمند است. در مطالعه های اخیر بیان *VEGF* و *VEGF-R* در بیماران AML مشاهده شده است.

آرسنیک تری اکساید به عنوان یک داروی چند هدفی (Multi target) شناخته شده است. آرسنیک تری اکساید قادر به فعال کردن *JNKs* می باشد. *JNKs* یک پروتئین کیناز فعال شده میتوژنی است که با فعال کردن *ROS* و به دنبال آن فعال شدن *Cyt P450* و *P38 MAPK* منجر به القای آپوپتوز و هم چنین باعث مسیر *PI3K-Akt-mTOR* شده و از سوی دیگر، *JNKs* سبب افزایش بیان *PTEN* که یک سرکوبگر تومور است؛ می شود که منجر به مهار *PI3K-Akt-mTOR* خواهد شد. از آن جایی که مسیر *PI3K-Akt-mTOR* مسیر حفظ حیات سلول شناخته می شود؛ مهار این مسیر می تواند مرگ سلولی را افزایش دهد. هم چنین در مطالعه های گذشته نشان داده اند که آرسنیک تری اکساید باعث فعال شدن سیتوکروم C و فعال شدن مسیر آبشاری کاسپازها و در نهایت آپوپتوز می شود (۱۷).

تالیدوماید با اثر بر روی ژن های مسیر رگ زایی می تواند از توسعه سرطان پیشگیری کند. تالیدوماید اثر مهاری خود را بر روی رگ زایی توسط مهار *β-FGF* در *rabbit cornea* و توسط مهار *VEGF* در *murine model* نشان داد (۱۸، ۱۹).

تالیدوماید به علت ویژگی ضد رگ زایی خود روی

- 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, ovarian and 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.

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

¹Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Hematology, 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 μ M and 1 μ M, respectively. The selective doses of thalidomide in the KG-1 and U937 cell lines were 80 μ M and 60 μ M, 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