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

مقاله پژوهشی

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

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

چکیده

سابقه و هدف

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

مواد و روش‌ها

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

یافته‌ها

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

نتیجه گیری

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

کلمات کلیدی

آرسنیک، تالیدومایدر، لوسمی میلوئیدی حاد

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

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

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 تومووری در *In vitro* ، VEGF را ترشح می‌کنند(۴، ۳). تولید VEGF و رسپتورش به طور مستقیم میزان رگ‌زایی در تومور را کنترل می‌کنند. با توجه به این که VEGF نقطه استراتژیکی در تنظیم رگ‌زایی در تومور است، هدف مهمی در وقایع درمانی محسوب می‌گردد(۶، ۵). استفاده از آنتی‌بادی بر علیه VEGF و رسپتور آن و یا استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کیناز، نتایج مطلوبی در مطالعه‌های کلینیکی در ارتباط با درمان تومورها داشته است(۷). داروها با اساس آرسنیک به عنوان عوامل شیمی درمانی مؤثر برای درمان بیماری‌های مختلف و برخی از تومورها استفاده شده است. در سال‌های اخیر As2O3 به عنوان یک ماده ضد لوسمی بسیار قوی به خصوص در برابر لوسمی پرومیلوسیتی حاد(APL) شناخته شده است(۸). آرسنیک تری‌اکسید در دوزهای پایین به تنهایی نمی‌تواند موجب القای آپوپتوز شود و برای حذف سلول‌های توموری با آن دوزهای بالا نیاز است، اما دوز بالا موجب عوارض جانبی بر روی بیماران APL می‌شود(۹). به منظور کاهش دوز آرسنیک تری‌اکساید و دسترسی به افزایش اثرات شیمی‌درمانی، روش‌های درمانی به صورت استفاده ترکیبی از داروهایی که مکانیسم مشابه‌ای برای جلوگیری از تکثیر و یا از بین بردن سلول‌های سرطانی دارند؛ باید طراحی شوند، که از یک طرف موجب افزایش تاثیر درمان و از طرف دیگر موجب کاهش اثرات ناخواسته گردند(۱۱، ۱۰). تالیدومایید دارای خواص ایمونومدولاتوری، ضد التهابی و آنتی‌آنژیوژنیک می‌باشد. تالیدومایید در سال۱۹۵۶ اولین بار در آلمان تولید شد و به عنوان داروی بی‌خوابی و رفع تهوع صبحگاهی در خانم‌های باردار به مصرف رسید ولی به دنبال داشتن عوارض تراتوژنیک مصرف آن متوقف گردید. با وجود عوارض جدی که متاسفانه این دارو ایجاد می‌کند، تحقیق در زمینه تاثیرات بالقوه این دارو جذابیت خاصی برای دانشمندان دارد و مشخص گردید که این دارو یک داروی بسیار مناسب بر علیه التهاب و سرطان است(۱۲، ۱۰). این دارو با اثر سرکوب‌کنندگی بر مرحله مهم تشکیل رگ یعنی خاموشی بیان اینتگرین به علت اثر سرکوب‌کنندگی بر INF-γ , TNF-α 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 تومووری بوده و در مطالعه‌های تومورژنیسیتی و تمایز مورد استفاده قرار می‌گیرند. رده سلولی U937 نمونه AML بیمار ۳۷ ساله با لوسمی میلوژنی M5 می‌باشد که بسیاری از خصوصیات مونوسیت را به نمایش می‌گذارد و مورد استفاده مطالعه‌های رفتاری و تمایزی مونوسیت‌ها و نیز به عنوان مدلی برای نشان دادن تمایز ماکروفاژ/ مونوسیت، آزمایش‌های ضد توموری و تومورژنیسیتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به طور معمول درمان(7+3) AML شامل ترکیبی ازcytarabine و یک anthracycline از قبیل daunorubicin (DNR) یا anthracenedione (mitoxantrone) است که در مطالعه‌های تحقیقاتی آزمایشگاهی استفاده می‌شوند(۱۳). از مجموع آن چه گفته شد برآن شدیم که برای اولین بار به ارزیابی اثر ترکیبی دو داروی آرسنیک تری‌اکساید وتالیدومایید به عنوان یک ترکیب جدید با خاصیت ضد سرطانی منحصر به فرد بر روی بیان ژن *VEGF A* و بررسی آپوپتوز در محیط آزمایشگاهی بر روی سل لاین‌های مقاوم و حساس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

به داروهای متداول شیمی‌درمانی 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 پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین کشت و نگهداری می‌شود. سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت و ۵٪ دی‌اکسید کربن، انکوبه خواهند شد.

Microculture Tetrazolium Test (MTT):

برای اندازه‌گیری اثر مهاری تالیدومایدو(سانتاکروز) و آرسنیک تری اکساید(سینا دارو) برروی فعالیت متابولیکی سلول‌های U937 و KG-1 به روش MTT Assay [برای ساخت محلول MTT ، ۵ میلی گرم پودر MTT را در ۱ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر رسانده تا استوک ۰/۵ mg/mL ساخته شود(این محلول به صورت تازه استفاده می‌شود)]. در ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت از پودرMTT (مشتق از نمک‌های تیازول) و محلول DMSO (دی‌متیل 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 سانتی‌گراد 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 الایزا ریدر در طول موج ۵۷۸ نانومتر خوانده خواهد شد. سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰۰–۵ µmol تالیدومایدو و ۵–۰/۴ µmol آرسنیک به مدت ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار می‌شوند.

سنجش میزان آپوپتوزسلولی به روش فلوسیتومتری:

بدین منظور ۲۴ و ۴۸ ساعت پس ازتیمار نمودن رده‌های سلولی KG-1 و U937 توسط آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدو و نیز ترکیب آرسنیک تری‌اکساید با تالیدومایدو که در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شده بودند، با استفاده از کیت رنگی دوگانه Annexin/PI سلول‌ها جهت بررسی میزان آپوپتوز رنگ‌آمیزی شدند.در این روش سلول‌های تیمار شده با بافر شسته شد و سوسپانسیون سلولی تهیه گردید(۱×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر). 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 میکرولیتر از رنگ آنکسین با غلظت استوک ۰/۵ mg/mL و ۱µL از PI با غلظت استوک ۰/۱ mg/mL اضافه شده بود، افزوده و لوله‌ها به آرامی ورتکس 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 جلوبرنده و معکوس

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

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

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

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

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

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

یافته‌ها

بررسی‌های MTT در رده سلولی KG-1:

نتایج حاکی از آن است که در رده سلولی KG-1 اثر آرسنیک تری‌اکساید در دوزهای ۱/۶۱۸ (اگر چه مقدار دوز آرسنیک تری‌اکساید در رده سلولی KG-1 یک مقدار عددی می‌باشد و یک نسبت نیست؛ با این وجود این دوز نتایج مؤثرتری نسبت به دوزهای بالا و پایین‌تر خود نشان داده است. اخیراً استفاده از این نسبت در پروژه‌های مربوط بهDrug discovery بررسی شده است) تا ۵ میکرومولار و اثر تالیدومایید 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 تالیدومایید 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 تالیدومایید در دوزهای ۶۰ تا ۱۰۰ میکرومولار قابل توجه بوده است(نمودار ۲). هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو نشان می‌دهد ۱ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید و۶۰ میکرومولار تالیدومایید می‌توانند کشندگی بیشتری به دنبال داشته باشند(نمودار ۲).

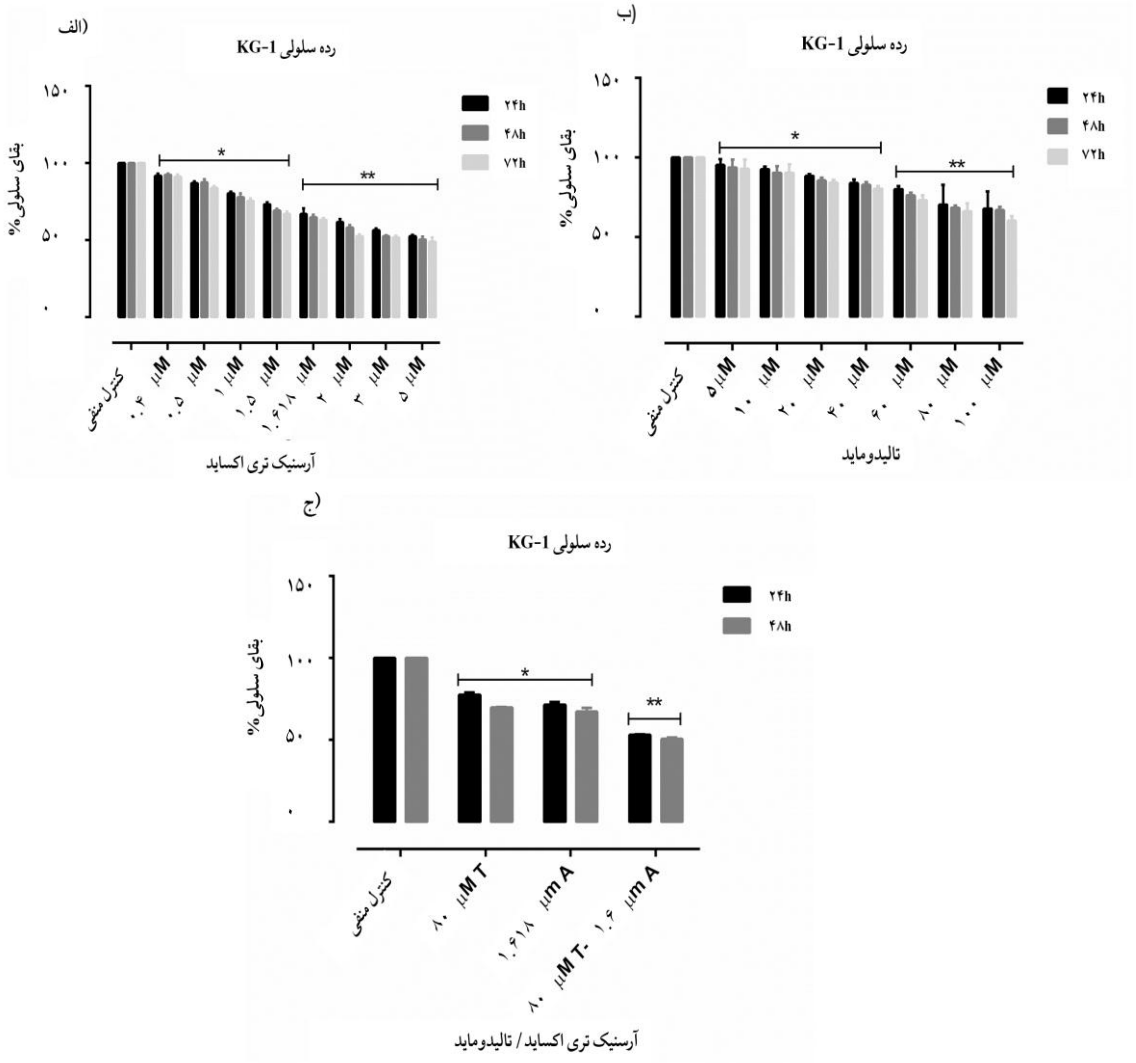
همان طور که نتایج نمودارهای فوق نشان می‌دهد درصد بقای سلول‌های تیمار شده با آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید در یک روند وابسته به دوز و زمان نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد.

در ادامه جهت تایید نتایج بقا حاصل از آزمایش MTT، به منظور ارزیابی اثر القایی آرسنیک تری‌اکساید به تنهایی یا در ترکیب با تالیدومایید بر فعالیت کشندگی و مهار رشد سلولی و مشخص شدن این که این اثر با واسطه آپوپتوز و یا با واسطه نکروز سلولی است، رنگ‌آمیزی Annexin/PI انجام شد و درصد سلول‌های آپوپتوتیک تعیین گردید. نتایج Annexin/PI مؤید این مسئله است که آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید 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 تالیدومایید بر بقا و رشد دو رده سلولی KG-1 و U937 در یک بازه زمانی ۴۸ ساعتی صورت گرفت.

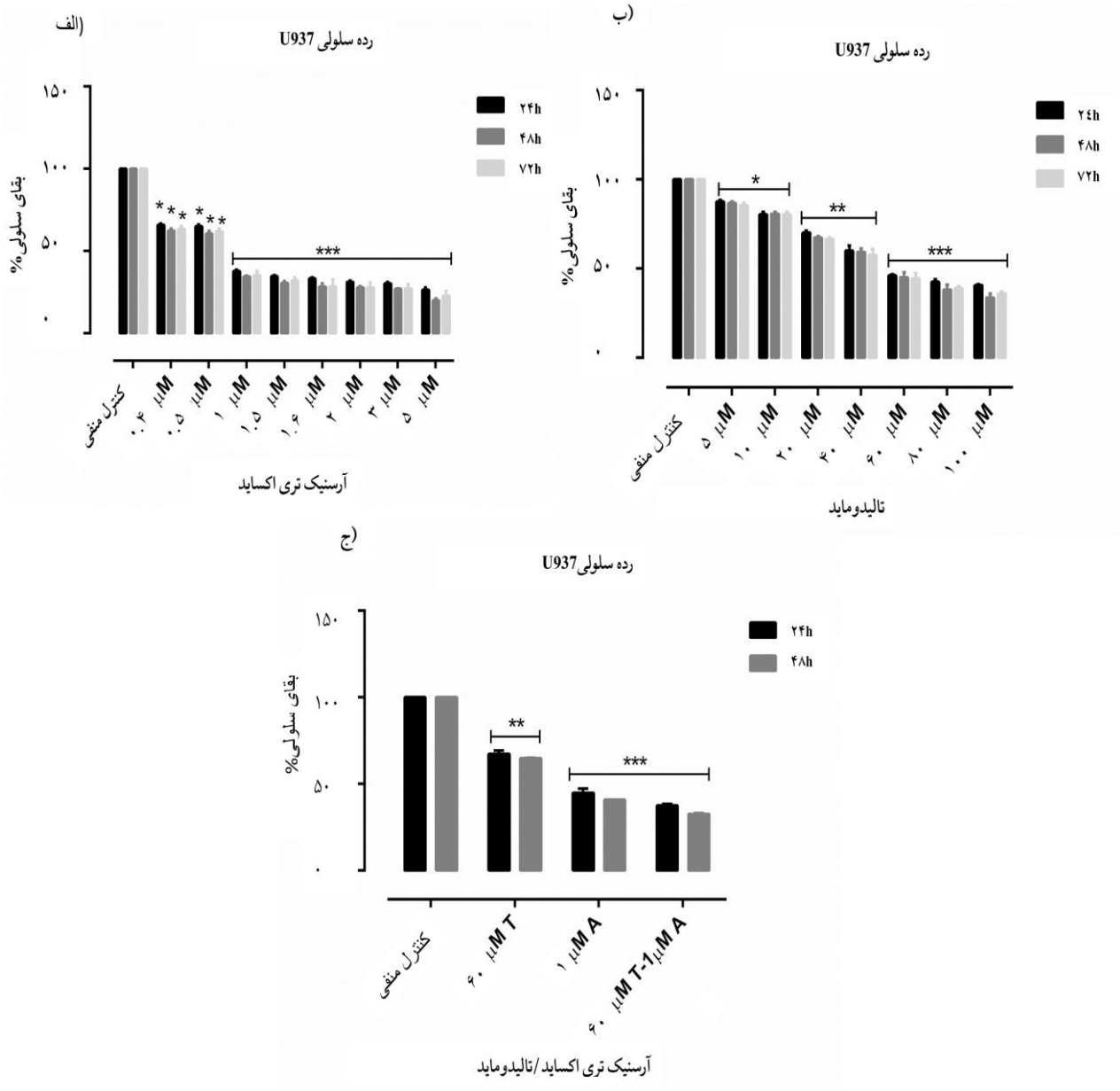
در این آزمایش تنها جمعیت‌هایی که $Annexin^+$ و یا $Annexin^+/PI^+$ باشند حائز اهمیت بوده و جمعیت‌های PI^+ به تنهایی حاکی از نکروز سلولی بوده که فاقد اهمیت می‌باشند(شکل‌های ۱ و ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]



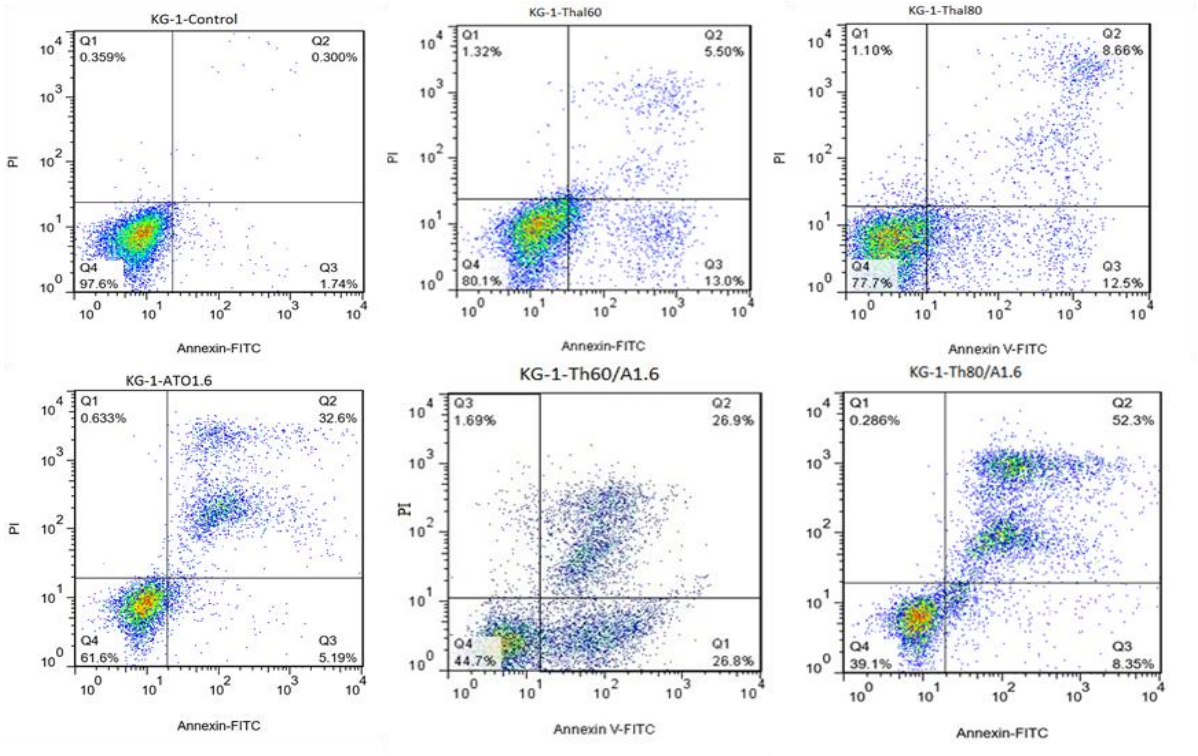
نمودار ۱ : A) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(µM ۵-۰/۴) آرسنیک تری‌اکساید بر رشد سلول‌ها و بقا. B : نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(µM ۱۰۰- ۵) تالیدومایدو بر رشد سلول‌ها و بقا. C : نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدو و هم‌چنین اثر ترکیبی آن‌ها بر رشد سلول‌ها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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

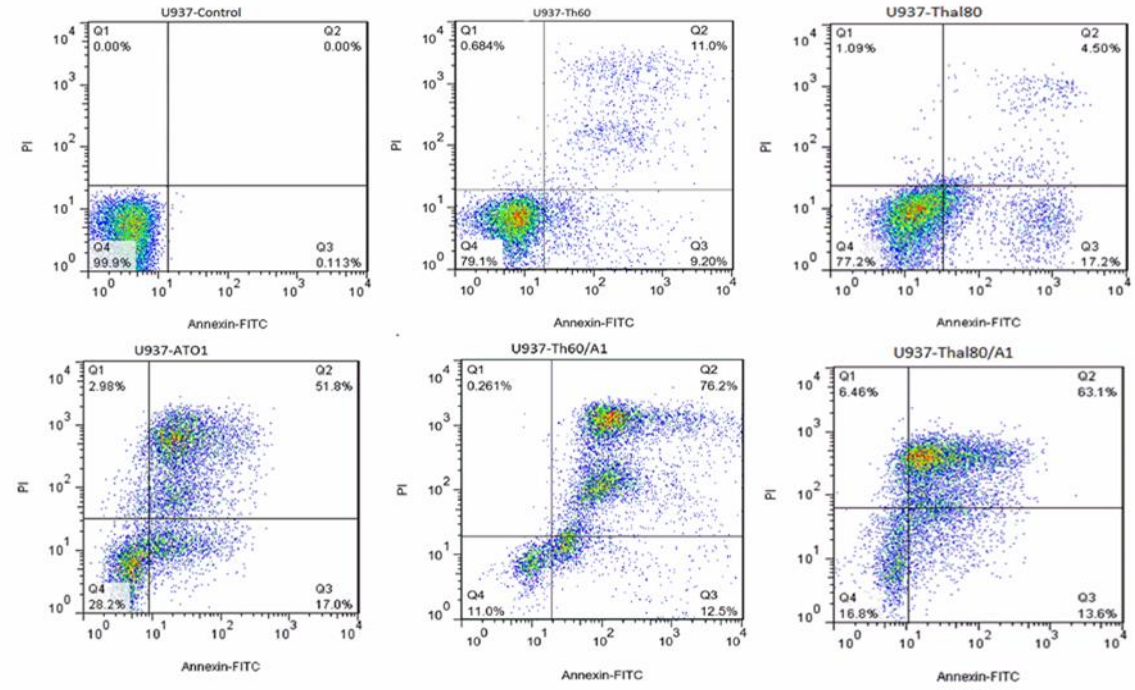


نمودار ۲ : A) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(µM ۴-۰/۵) آرسنیک تری‌اکساید بر رشد سلول‌ها و بقا. B) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف(µM ۱۰۰- ۵) تالیدومایید بر رشد سلول‌ها و بقا. C) نمودار ستونی اثر مهاری غلظت‌های مختلف آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایید و هم چنین اثر ترکیبی آن‌ها بر رشد سلول‌ها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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

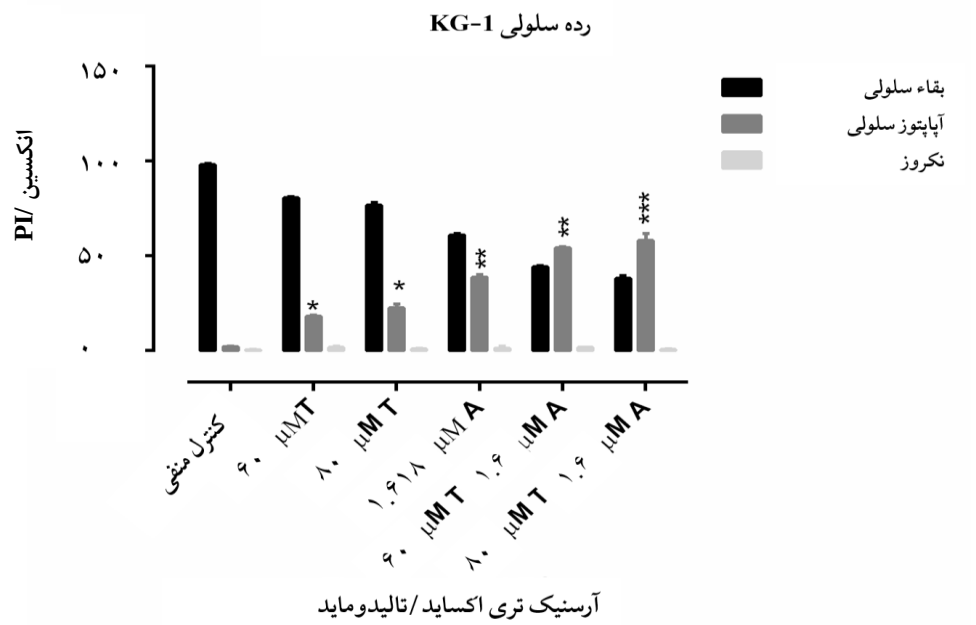


شکل ۱: بررسی آپوپتوز با داروهای آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدبر روی KG-1

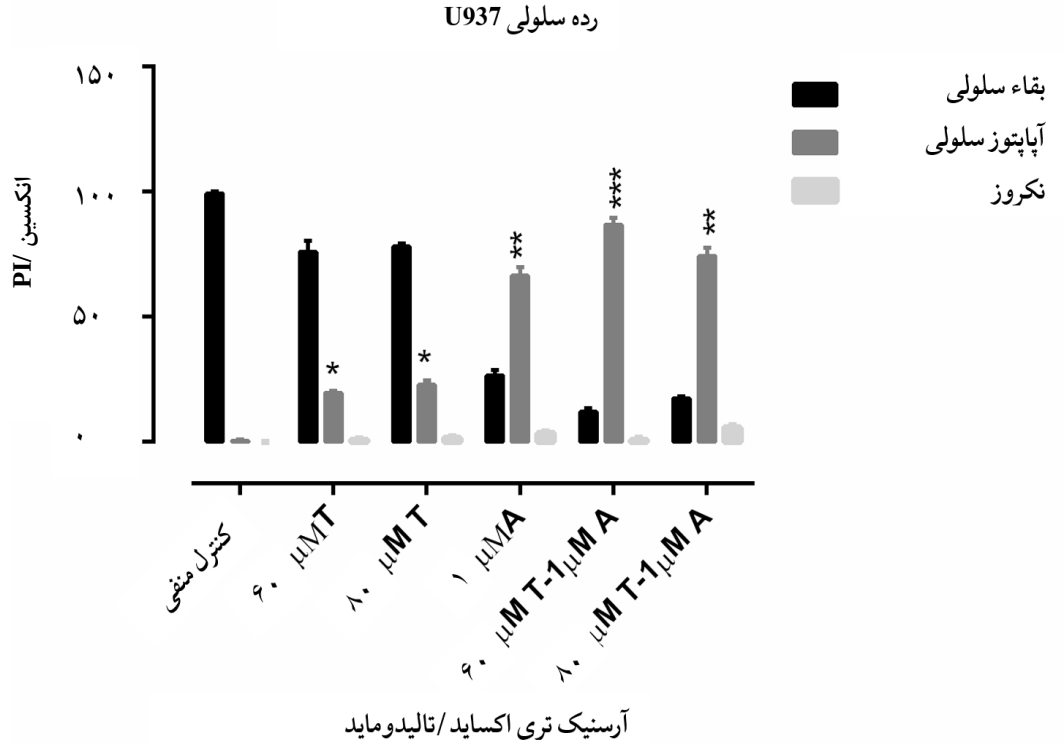


شکل ۲: بررسی آپوپتوز با داروهای آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایدبر روی U937

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

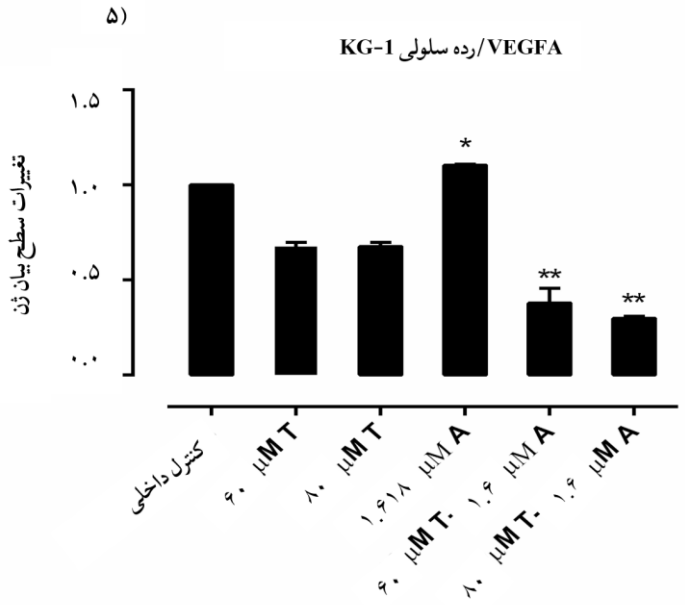


نمودار ۳ : نتایج بررسی آپوپتوز سلولی حاصل از رنگ آمیزی **Annexin/PI** در رده سلولی **KG-1** در بازه زمانی ۴۸ ساعت به دنبال تیمارسازی با غلظت‌های(۱/۶۱۸μM) آرسنیک تری‌اکساید و غلظت(μM ۶۰ و۸۰) تالیدومایید و مقادیر ترکیبی آن‌ها را نشان می‌دهد.

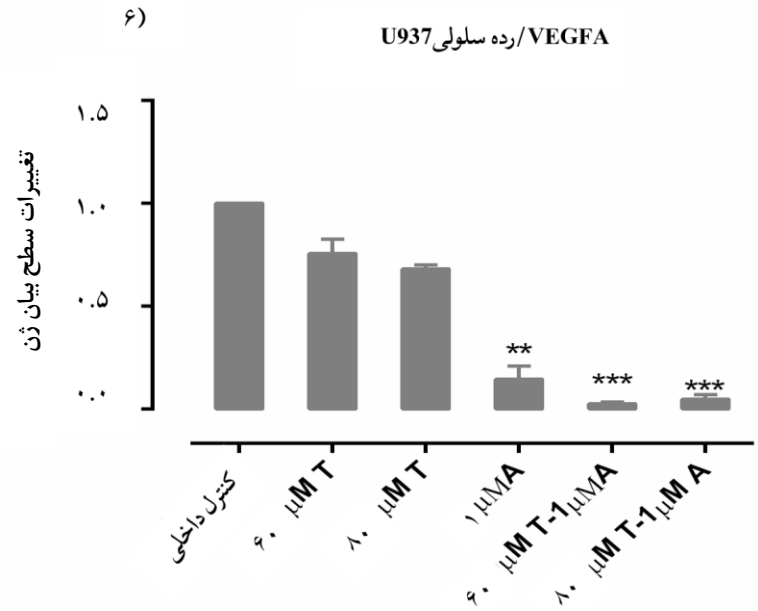


نمودار ۴: نتایج بررسی آپوپتوز سلولی حاصل از رنگ‌آمیزی **Annexin/PI** در رده سلولی **U937** در بازه زمانی ۴۸ ساعت به دنبال تیمارسازی با غلظت‌های (μM ۱) آرسنیک تری‌اکساید و غلظت(μM ۶۰ و۸۰) تالیدومایید و مقادیر ترکیبی آن‌ها را نشان می‌دهد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]



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



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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

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

نتایج نشان داد که سلول‌های KG-1 و U937 تیمار شده با دوزهای ترکیبی آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد، یک افزایش آپوپتوتیک قابل توجهی را نسبت به دوزهای آرسنیک تری اکساید و تالیدومایـد به تنهایی، نشان می‌دهد(نمودارهای ۳ و ۴).

نتایج بررسی اثر آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد 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 تالیدومایـد کاهشی 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 تالیدومایـد و ۱/۶۱۸ آرسنیک تری‌اکساید بیشتر نشان داده شده است (نمودار ۵).

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

نتایج بررسی میزان بیان ژن *VEGF A* در رده سلولی U937 نشان می‌دهد میزان بیان در دوزهای ۶۰ و ۸۰ میکرومولار تالیدومایـد کاهشی بوده و در دوز ۱ میکرومولار آرسنیک تری‌اکساید نیز کاهشی بوده و هم چنین اثر ترکیبی این دو دارو میزان بیان را به نسبت کنترل کاهش می‌دهد، این کاهش بیان در دوز ۶۰ میکرومولار تالیدومایـد و ۱ آرسنیک تری اکساید 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 آپوپتوز درسلول‌های APL و non-APL می‌شود. بنابراین تصمیم گرفتیم برای اولین بار به ارزیابی اثر ترکیبی تالیدومایـد و آرسنیک تری‌اکساید بر روی بیان ژن *VEGF A* در سل‌لاین‌های U937 و KG-1 بپردازیم.

در این مطالعه ارزیابی اولیه توسط MTT به منظور تعیین اثرات توکسیک آرسنیک تری‌اکساید و تالیدومایـد 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 میکرو مولار برای تالیدومایـد و هم چنین دوز ترکیبی(۸۰µMT -۱/۶۱۸µMA) برای رده‌ی سلولی KG-1 در نظر گرفته شد. هم چنین دوزهای انتخابی توسط آزمایش ۱ µM برای آرسنیک تری‌اکساید و ۶۰ µM و ۸۰ برای تالیدومایـد در رده سلولی U937 در نظر گرفته شد. هم چنین دوز ترکیبی(۱ µM A -۶۰µM T) برای رده‌ی سلولی U937 در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان آپوپتوز و نکروز توسط این دوزها، آزمایش فلوسایتومتری انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که این دوزهای آرسنیک و تالیدومایـد و اثر ترکیبی آن‌ها قادر به القای درصد قابل توجهی از آپوپتوز می‌باشد. علاوه بر آن که مطالعه‌های گذشته بیانگر آن هستند که دوز استاندارد برای القای آپوپتوز توسط آرسنیک تری‌اکساید در محدوده غلظتی ۲–۰/۵ میکرو مولار 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 تالیدومایـد در مهار رشد و القای آپوپتوز 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

ترشح شده توسط سلول لوسمی با گیرنده‌های مربوطه در سطح سلول‌های اندوتلیال در ارتباط است و سلول‌های اندوتلیال را برای تولید فاکتورهای رشد که بر روی سلول‌های لوسمیک قرار دارند؛ تحریک می‌کند در نتیجه فعالیت تکثیری و مقاومت دارویی افزایش می‌یابد(۱۶). بنابراین درمان ضد آنژیوژنز بر اساس مهار فعالیت فیزیولوژیکی VEGF یک استراتژی جدید برای درمان هدفمند است. در مطالعه‌های اخیر بیان VEGF و VEGF-R در بیماران AML مشاهده شده است.

آرسنیک تری‌اکساید به عنوان یک داروی چند هدفی(Multi target) شناخته شده است. آرسنیک تری‌اکساید قادر به فعال کردن JNKs می‌باشد. 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 مهار مسیر PI3K-Akt-mTOR شده و از سوی دیگر، JNKs سبب افزایش بیان PTEN که یک سرکوبگر تومور است؛ می‌شود که منجر به مهار PI3K-Akt-mTOR خواهد شد. از آن جایی که مسیر PI3K-Akt-mTOR مسیر حفظ حیات سلول شناخته می‌شود؛ مهار این مسیر می‌تواند مرگ سلولی را افزایش دهد. هم چنین در مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند که آرسنیک تری‌اکساید باعث فعال شدن سیتوکروم C و فعال شدن مسیر آبشاری کاسپازها و درنهایت آپوپتوز می‌شود(۱۷).

تالیدومایدبا اثر بر روی ژن‌های مسیر رگ‌زایی می‌تواند از توسعه سرطان پیشگیری کند. تالیدومایداثر مهاری خود را بر روی رگ‌زایی توسط مهار β-FGF در rabbit cornea و توسط مهار VEGF در murine model نشان داد(۱۹، ۱۸).

تالیدومایدبه علت ویژگی ضد رگ‌زایی خود روی چندین نوع از تومورها تحت ارزیابی قرار گرفته است، مثل بدخیمی‌های هماتولوژیک، میلوم مالتیپل و تومورهای جامد. در این مطالعه‌ها نشان داده شده است که تالیدومایدموجب کاهش بیان عوامل مؤثر در رگ‌زایی می‌شود(۲۴-۲۰).

استینز و همکاران در سال ۲۰۰۲ در مطالعه خود نتایج مشابهی را گزارش کردند که تالیدومایدبا پایین آوردن سطح FGF-2 و VEGF باعث آنتی آنژیوژنز می‌شوند(۲۵).

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

چن و همکارانش با بررسی‌هایی بر روی NB4 و آرسنیک تری‌اکساید افزایش آپوپتوز را به واسطه کنترل کردن bcl-2 و PML/RAR-α نشان دادند(۲۶).

یانگ و همکارانش در مطالعه‌ای بر روی سرطان ریه در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که آرسنیک تری‌اکساید با مهار فاکتورهایی از قبیل VEGF-A، VEGFR-2، HIF-1α و Notch-1 مسیر آنژیوژنز را مهار می‌کند(۲۷).

نتیجه‌گیری

اثر ترکیبی این دارو سبب افزایش آپوپتوز سلولی و کاهش میزان بیان ژن اصلی در رگزایی *(VEGF A)* می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و نتایج مطالعه‌های گذشته این دو دارو به صورت ترکیبی می‌توانند 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 تامین بودجه طرح قدردانی می‌گردد.

References:

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]

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

Original Article

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

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

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

Abstract

Background and Objectives

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

Materials and Methods

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

Results

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

Conclusions

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

Key words: Arsenic, Thalidomide , Acute Myeloid Leukemia

Received: 30 Apr 2018
Accepted: 23 Sep 2018

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-09]