

بیان ژن Survivin در بیماران لوسمی پرومیلوسیتیک حاد در زمان تشخیص و بعد از مصرف دارو

محمدرضا نوری دلویی^۱، مجید ذکی دیزجی^۲، سهیلا خاوندی^۳، شهربانو رستمی^۴، مهدی یاسری^۵، کامران علی مقدم^۶، اردشیر قوامزاده^۷، سید حمیداله غفاری^۸

چکیده

سابقه و هدف

Survivin (SVV) یک مهار کننده آپوپتوز است که بیان آن در اکثر سرطان‌ها بالا رفته و با مقاومت به شیمی درمانی، افزایش عود بیماری و کاهش بقای بیمار همراه است. هدف در این پژوهش، بررسی بیان ژن SVV در مراحل مختلف بیماری در بیماران APL (Acute Promyelocytic Leukemia) بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مورد - شاهده، نمونه خون ۵۰ بیمار APL مراجعه کننده به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی در سه زمان تشخیص، بهبودی و عود جمع آوری گردید. سپس بیان ژن SVV توسط Real time PCR بررسی و نتایج توسط SPSS ۱۷ با آزمون‌های کروسکال والیس و Tukey تحلیل شد.

یافته‌ها

این پژوهش برای اولین بار نشان داد که بیان ژن SVV در بیماران APL، به طور معنی‌داری نسبت به کنترل ($91.0/5 \pm 69.9$; Mean $\pm$ SD) بالا می‌رود. این افزایش بیان هم در زمان تشخیص ($49.81/4 \pm 41.12/2$) و هم در زمان عود ($45.84/2 \pm 51.33/6$) دیده شد ($p < 0.01$). در بیماران فوق بعد از استفاده از داروی آرسنیک تری اکساید، بیان به طور معنی‌داری نسبت به گروه تشخیص پایین آمد ($p < 0.01$).

نتیجه گیری

یافته‌ها نشان داد که SVV در حفظ سلول سرطانی APL نقش دارد و یکی از سازوکارهای احتمالی القای آپوپتوز توسط آرسنیک تری اکساید، می‌تواند کاهش بیان این ژن باشد. هم چنین می‌توان از ژن SVV به عنوان مارکر پیگیری استفاده کرد.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آرسنیک تری‌اکساید، القای بهبودی، عود

تاریخ دریافت: ۱۹/۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۹/۹/۲۰

- ۱- PhD ژنتیک - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۳- دانشجوی پزشکی - دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز
- ۴- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- دانشجوی PhD آمار حیاتی - دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۶- فوق تخصص خون و انکولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۷- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۸- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - کارگر شمالی - کدپستی: ۱۴۱۱۱

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute Promyelocytic Leukemia)، یکی از انواع لوسمی‌های میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia) می‌باشد. بروز این لوسمی طبق گزارش‌های مختلف، در ۳۴٪-۴/۸٪ بیماران AML دیده می‌شود که بسته به پیشینه قومی، میزان بروز آن متفاوت است (۱). میزان بروز سالانه AML تقریباً معادل ۳/۶ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (۲). در ایران از بروز APL اطلاعات کاملی در دست نیست، اما تحقیقات نشان‌دهنده بروز بالای آن می‌باشد (۳).

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، زمانی یکی از زیر گروه‌های کشنده لوسمی بود که امروزه در بیشتر بیماران قابل درمان است (۴-۶). علت این موفقیت، در دسترس بودن داروهایی مانند آل - ترانس رتینوئیک اسید (ATRA)، آرسنیک تری‌اکساید (ATO) و ترکیبات آنتراسیکلین می‌باشد (۷). با وجود این داروها، پتانسیل برای درمان لوسمی پرومیلوسیتیک حاد به بیش از ۷۵٪ رسیده است. علاوه بر عواض جانبی این داروها، ۲۰٪-۱۰٪ بیماران به خاطر بروز ناگهانی بیماری در مراحل اولیه می‌میرند و عود بیماری در طول درمان چشمگیر می‌باشد (۸، ۹). به علت این که لوسمی پرومیلوسیتیک حاد بیشتر لوسمی دوران جوانی می‌باشد، اطلاعات در مورد زیست‌شناسی مولکولی این لوسمی، موجب اداره خوب بیماران و کاهش مرگ اولیه می‌شود و درصد بقا (survival) را بالا می‌برد.

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، یک ساز و کار کلیدی در کنترل هموستازی بافت می‌باشد. از آن جا که مرگ سلولی در حفظ سلول نقش ضروری دارد، به همین خاطر فرار از آپوپتوز، یکی از مشخصه‌های اصلی سرطان است. تنظیم مناسب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، بیشتر در بخش‌های سلولی که پتانسیل تقسیم ذاتی بالایی دارند مانند سیستم هماتوپویتیک اهمیت زیادی دارد. به صورتی که کم شدن آپوپتوز سلولی، با ایجاد حالت بدخیمی همراه است که ممکن است موجب ایجاد لوسمی و لنفوم گردد (۱۱، ۱۰). پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (Inhibitor of Apoptosis proteins, IAP) مهم‌ترین پروتئین‌های داخل

سلولی هستند که با جلوگیری از فعال شدن کاسپازهای عمل‌کننده (effector)، از مرگ سلولی در مرکز سلولی تنظیم‌کننده این مسیر، ممانعت می‌کنند (۱۳-۱۱).

Survivin (SVV)، یک مهار کننده آپوپتوز است که بیان آن در اکثر سرطان‌ها بالا می‌رود و با مقاومت به شیمی‌درمانی، افزایش عود بیماری و کاهش بقای بیمار همراه است (۱۵، ۱۴). برخلاف پیچیدگی ژنتیکی و چند عاملی بودن، به نظر می‌رسد SVV در کل سرطان‌ها در دو فرآیند کنترل ازدیاد سلولی و تنظیم طول عمر سلول درگیر است (۱۶). استفاده از روش سیگنالینگ SVV ممکن است برای پیش‌بینی و پیش‌آگهی در تشخیص سرطان مهم بوده و یک روش جدید درمانی را برای درمان سرطان پیشنهاد کند. بیان بالای SVV در سرطان‌های هماتولوژیک نیز مشاهده شده است (۱۷). در این پژوهش بیان ژن SVV در زمان‌های تشخیص و بعد از مصرف دارو در بیماران مبتلا به سرطان APL بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت مورد - شاهدهی صورت گرفت. از اول مهر ۸۷ تا فروردین ۸۹، از بیمارانی که به مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی مراجعه می‌کردند، نمونه‌گیری انجام شد. در این مدت زمان، نمونه‌ها از ۵۰ بیمار (۲۶ مرد، ۲۴ زن، متوسط سن ۳۴/۹۱ سال، محدوده سنی ۱۴-۵۹ سال) در سه زمان تشخیص، بهبود و عود جمع‌آوری گردید. این نمونه‌گیری به صورت پیگیری بیمارانی نبود و بیماران سه گروه، متفاوت بودند. هم چنین ۱۶ نمونه خون محیطی از افراد سالم گرفته و به عنوان کنترل استفاده شد (جدول ۱). قبل از هرگونه نمونه‌گیری از افراد بیمار و گروه کنترل، تک افراد در جریان اهداف مطالعه قرار گرفتند و رضایت‌نامه کتبی از ایشان گرفته شد.

جد/سازی سلول‌های تک هسته‌ای (MNCs : Mononuclear Cells):

در حدود ۵ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی تیمار شده با EDTA از هر یک از افراد سالم و بیمار جمع‌آوری شد.

سلول‌های تک هسته‌ای، به کمک گرادیانت چگالی بر روی فایکول جداسازی شدند.

جدول ۱: تعداد نمونه‌های خون در چهارگروه کنترل نرمال، تشخیص، بهبود و عود

تعداد نمونه	گروه
۱۶	کنترل نرمال
۲۰	تشخیص
۱۵	بهبود
۱۵	عود

استخراج RNA تام از سلول‌های تک هسته‌ای و ساخت cDNA :

RNA تام با استفاده از محلول استخراج RNX plus (سیناژن) و با دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی شد. برای ساخت cDNA در این پژوهش، از کیت ساخت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت فرمتاز استفاده شد. ۲ میکروگرم از RNA تام به عنوان الگو برای ساخت cDNA استفاده شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

آغازگر و پروب:

آغازگرهای کلونینگ، هم چنین پروب TaqMan و آغازگرهای مورد نیاز برای انجام Real-Time PCR توسط شرکت بایونیر ساخته شدند. پروب‌های TaqMan مربوط به SVV و GAPDH (Glyceraldehyde - 3 - phosphate و dehydrogenase) در انتهای ۵' با ۶- کربوکسی فلورسین (FAM) به عنوان رنگ گزارشگر و در انتهای ۳' با ۶- کربوکسی تترا متیل رودآمین (TAMRA) به عنوان رنگ خاموش‌کننده، نشان‌دار شدند (جدول ۲).

راه‌اندازی روش Absolute quantitative Real-Time PCR :

۱- ساخت پلاسمید حاوی قطعات ژنی SVV و GAPDH : برای انجام Absolute quantitative Real-Time PCR ،

نیاز به یک منحنی استاندارد بود. بسیاری از مراحل که در زیر شرح داده می‌شود، به منظور ایجاد منحنی استاندارد انجام شد. بدین منظور با استفاده از آغازگرهای کلونینگ، cDNA ساخته شده از رده سلولی NB4 (رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) تکثیر شد و قطعات تکثیر شده مربوط به ژن SVV (۳۵۴ bp) و ژن GAPDH (۵۳۵ bp) پس از استخراج از ژل آگارز، به طور جداگانه به کمک کیت T/A کلونینگ (Cloning Ins T/A clone™ PCR Product ، فرمتاز) به داخل وکتور کلون شده و به داخل باکتری سویه DH5α ترانسفورم شدند.

پس از شناسایی باکتری‌های نو ترکیب با روش غربالگری آبی/سفید و تأیید آن به کمک کلونی PCR ، استخراج پلاسمید از باکتری نو ترکیب انجام شد. هر یک از قطعات کلون شده به کمک دو آنزیم محدودالایر KpnI و BamHI (فرمتاز) از وکتور بریده شد و به کمک آنزیم T4 Ligase (فرمتاز) به یکدیگر متصل و دوباره به داخل وکتور pTZ57R/T کلون شده و سپس ترانسفورم شد. پس از غربالگری مجدد باکتری نو ترکیب و تأیید با PCR ، پلاسمید استخراج شد و کل قطعه وارد شده به پلاسمید با آغازگرهای عمومی M13 تعیین توالی گردید و صحت آن تأیید شد.

۲- رسم منحنی استاندارد :

پلاسمید نو ترکیب، به کمک آنزیم محدودالایر Hind III که یک جایگاه برش روی پلاسمید دارد بریده شد و به شکل خطی در آمد.

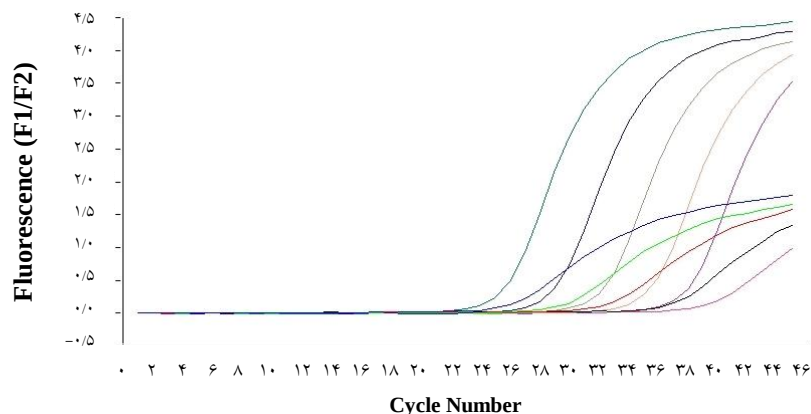
پلاسمید بریده شده روی ژل برده شد و پس از استخراج از ژل، غلظت پلاسمید با دو روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز (مقایسه با باندهایی با غلظت مشخص) به دست آمد. سپس از پلاسمید، رقت‌های متوالی ۱۰^۶ - ۱۰^۲ کپی ژن در هر ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و برای تهیه نمودار استاندارد به کار رفت.

پس از آن که شرایط انجام Real-Time PCR بهینه شد، روی همه رقت‌های پلاسمید، Real-Time PCR انجام شد و نمودار استاندارد بر اساس مقدار سیکل آستانه (Ct value) رقت‌های مختلف رسم شد (شکل ۱).

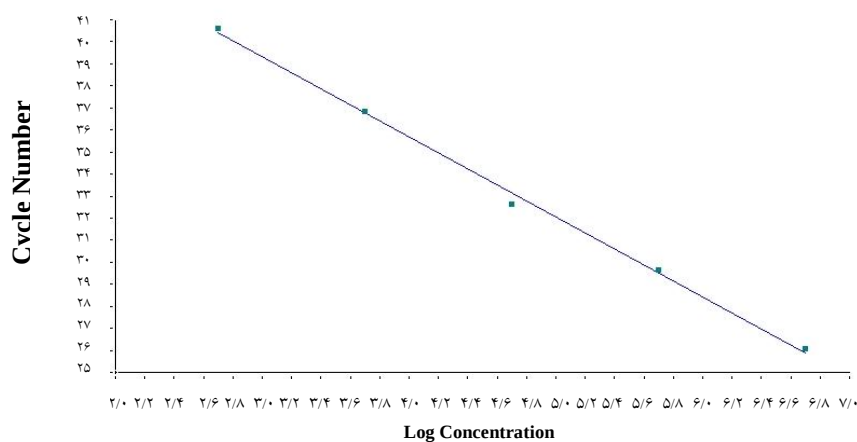
جدول ۲: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای کلونینگ و Real-Time PCR

توالی		نام
Amplicon size		
آغازگرهای کلونینگ		
۳۴۵ bp	5'- CACCGCATCTCTACATTCAA - 3'	SVV Clone-F
	5'- CACTTTCTCCGCAGTTTCCT -3'	SVV Clone-R
۵۳۲ bp	5'- GGTCATCCCTGAGCTGAAC- 3'	GAPDH Clone-F
	5'- TTGATGGTACATGACAAGGTG-3'	GAPDH Clone-R
آغازگر و پروب های Real-Time PCR		
۷۶ bp	5'-CCCACTCCTCCACCTTTG-3'	GAPDH-F
	5'-TCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'	GAPDH-R
	5'-CTGGCATTGCCCTCAACGACCA-3'	GAPDH-Probe
Probe labeled with FAM and TAMR		
۱۵۲ bp	5'-CCAGATGACGACCCCATAGAG-3'	SVV-F
	5'-TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT-3'	SVV-R
	5'-CATTCGTCCGGTTGCGCTTTCC-3'	SVV-Probe
Probe labeled with FAM and TAMR		

الف

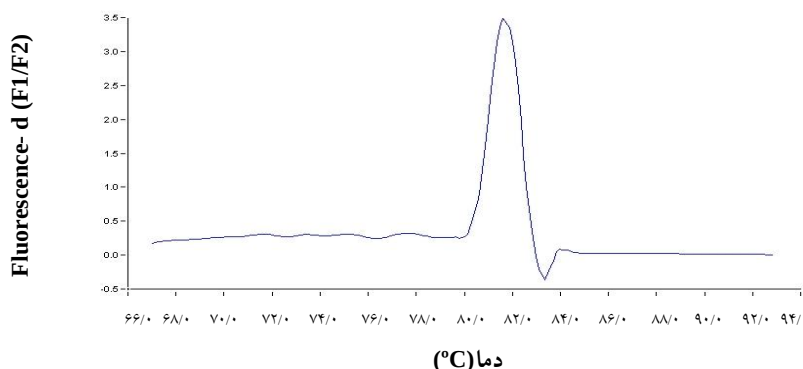


ب



شکل ۱: الف) منحنی های مربوط به انجام Real-Time PCR روی رقت های متوالی پلاسمید SVV- GAPDH. ب) منحنی استاندارد SVV

(درجه خطا = ۰/۱۱۶ و شیب نمودار = -۳/۶۳۳)



شکل ۲: منحنی ذوب ژن SVV. تک دمایی و تیز بودن منحنی اختصاصیت آغازگرها را نشان می‌دهد.

داده‌ها از توزیع نرمال را نشان داد، برای مقایسه گروه‌ها از آزمون ناپارامتری کروسکال - والیس استفاده شد و در صورتی که این آزمون تفاوت معنی‌داری را میان گروه‌ها نشان می‌داد، از روش تصحیح توکی - کرامر در مقایسه‌های چندگانه برای مقایسه دو به دو میان گروه‌ها استفاده گردید. به این منظور از یک فرمان (Syntax) نوشته شده (<http://giyp.nl.marata/>) در SPSS ۱۷ استفاده شد. p value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان مقدار معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

راه‌اندازی روش *Absolute Quantitative Real-Time PCR* برای بررسی کمی مارکر SVV:

با انجام کلونینگ دو تایی ژن‌های SVV و GAPDH در داخل وکتور pTZ57R/T، پلاسمید نو ترکیب حاوی قطعات ژنی SVV و GAPDH ساخته شد. با استفاده از رقت‌های متوالی (10^2 تا 10^6) نسخه پلاسمید در حجم ۱۰ میکرولیتر این پلاسمید، منحنی استاندارد مربوط به ژن SVV رسم شد (شکل ۱). واکنش Real-Time PCR روی نمونه‌های خون محیطی گروه‌های کنترل و بیمار انجام شد.

تعیین اختصاصیت و حساسیت آغازگر SVV:

منحنی ذوب حاصل از PCR برای ژن Survivin به صورت تک پیک (peak) و تیز (sharp) به دست آمد (شکل ۲). باند حاصل از الکتروفورز در ژل ۲٪ و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید با نتایج Real-Time همخوانی داشت.

انجام واکنش *Quantitative Real-Time PCR*:

واکنش Real-Time PCR در دستگاه Roche Light Cycler (version 3.5) با شرایط زیر روی نمونه‌ها انجام شد: مخلوط واکنش (۲۰ میکرولیتر) شامل Taq DNA polymerase buffer (1X)، $MgCl_2$ (۵ میلی‌مولار)، dNTP (۲۵۰ میکرومولار)، ۵۰۰ نانومول از هر آغازگر، ۲۰۰ نانومول پروب Taq-Man، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲ میکرولیتر cDNA الگو بود. شرایط دمایی به شرح زیر بود: ۱ سیکل ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ سیکل شامل ۳ مرحله واسرشت شدن (۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه)، اتصال آغازگرها (۱۵ ثانیه در ۶۰ درجه) و extension (۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه). مقدار سیکل آستانه (Ct) هر نمودار به طور خودکار توسط دستگاه، روی نمودار استاندارد برده می‌شد و تعداد کپی ژن موجود در نمونه تخمین زده می‌گردید.

آنالیز آماری داده‌ها:

به منظور حذف خطای ناشی از مراحل مختلف کار به خصوص کیفیت RNA به دست آمده، ارقام به دست آمده مربوط به تعداد کپی رونوشت ژن SVV نرمالیزه شد. برای این منظور، از نسبت تعداد کپی رونوشت ژن SVV به تعداد کپی رونوشت ژن GAPDH همان نمونه استفاده شد. از آن جا که عدد به دست آمده بسیار کوچک بود، برای به دست آوردن عدد صحیح، عدد حاصل از تقسیم، در عدد 10^6 ضرب شد. از آن جایی که آزمون کلمگروف - اسمیرنف انحراف

جدول ۳: نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها. بیان SVV در کنترل نسبت به گروه تشخیص و عود معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/01$) اما در مقایسه با گروه بهبود تفاوت مشخصی دیده نمی‌شود.

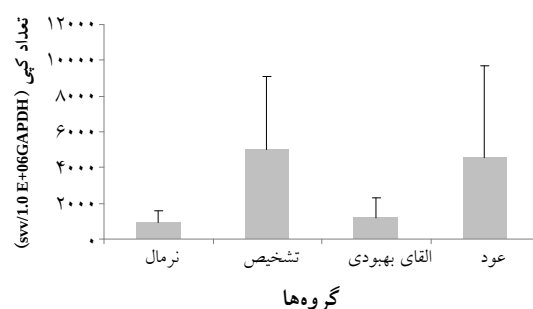
Absolute quantification		گروه
Median (IQR)	Mean $\pm$ SD	
۷۵۹/۹ (۳۰۴/۲ ، ۱۳۵۵/۴)	۹۱۰/۵ $\pm$ ۶۹۹	نرمال
۳۶۴۷/۲ (۲۳۸۴/۱ ، ۶۰۵۸/۳)	۴۹۸۱/۴ $\pm$ ۴۱۱۲/۲	تشخیص
۶۸۰/۸ (۴۲۴/۹ ، ۱۲۷۵/۱)	۱۱۶۳/۲ $\pm$ ۱۱۶۹/۲	بهبود
۳۵۳۴/۴ (۱۴۴۷/۹ ، ۵۳۸۲/۷)	۴۵۸۴/۲ $\pm$ ۵۱۳۳/۶	عود
بدون معنی		بهبود در مقابل نرمال
< ۰/۰۱		بهبود در مقابل عود
< ۰/۰۱		بهبود در مقابل تشخیص
< ۰/۰۱		نرمال در مقابل عود
< ۰/۰۱		نرمال در مقابل تشخیص
بدون معنی		عود در مقابل تشخیص

آزمایش کروسکال والیس (Kruskal Wallis) همبستگی معنی‌داری را بین مقدار بیان SVV و چهار گروه کنترل، تشخیص، بهبود و عود نشان داد. آزمایش آماری Tukey multiple comparisons correction، تفاوت بیان ژن SVV را در دو گروه تشخیص و عود نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نشان داد (هر دو $p < 0/01$). بیان SVV در گروه بهبود نسبت به گروه تشخیص به طور معنی‌داری پایین آمده بود ($p < 0/01$) (جدول و شکل ۳).

بحث

SVV کوچکترین عضو خانواده IAP ها می‌باشد که نقش مهم آن در سرطان به تدریج مشخص می‌شود. ژن SVV در بررسی transcriptome ژنوم انسان در سرطان‌های انسانی (در نیم‌رخ ژنی در سطوح بزرگ)، چهارمین transcriptome شایع بین سرطان‌ها شناخته شده است (۱۸). برخلاف بیان بالا در بیشتر سرطان‌ها، دیده شده SVV در بافت‌های نرمال بالغ، بیان کم یا غیر قابل تشخیص دارد، این یافته‌ها نشان می‌دهد که SVV پیشرفت سلول سرطانی به بدخیمی را تسهیل می‌کند.

بیان بالای SVV در سرطان، نقش ضروری این ژن در ازدیاد و نیز زنده ماندن (viability) سلول سرطانی و هم چنین نقش این ژن در ایجاد مقاومت به داروهای ضد سرطان، باعث شده که این ژن به عنوان کاندید برای



شکل ۳: تعداد کپی ژن SVV در چهار گروه کنترل نرمال، تشخیص، بهبود و عود (Mean $\pm$ SD). همان طوری که در نمودار ستونی دیده می‌شود، SVV به طور معنی‌داری در دو گروه تشخیص، عود (هر دو $p < 0/01$) بالا رفته است.

برای به دست آوردن حداقل حساسیت برای qRT-PCR، ۲ تا 2×10^5 سلول از NB4 به ۵ میلی‌لیتر از خون محیطی فرد سالم اضافه شد. از رقت‌های سریالی سلول‌های NB4 در خون محیطی، استخراج RNA و RT-PCR انجام شد. در این سیستم بالاترین حساسیت تشخیصی مشاهده شده، ۲ سلول در ۵ میلی‌لیتر خون بود.

بررسی بیان رونوشت ژن SVV در نمونه‌های خون محیطی افراد بیمار و سالم:

در افراد کنترل بیان پایینی از SVV مشاهده شد، در حالی که بیان این ژن در دو گروه تشخیص و عود بالا بود.

دارو درمانی مطرح شود (۲۳-۱۹، ۱۵، ۱۴).

در لوسمی‌ها گزارش‌های گوناگونی، بیان بالای SVV را نشان می‌دهند (۲۲، ۱۷، ۱۴). در این پژوهش‌ها از روش‌های گوناگونی مانند ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلات، نوردردن بلات، فلوئوسیتومتری، RT-PCR و qRT-PCR استفاده شده است. گزارش‌هایی که بر اساس RT-PCR به دست آمده‌اند، اکثراً خون افراد نرمال و لوسمی‌های مزمن را از نظر بیان SVV منفی گزارش کرده‌اند (۲۵، ۲۴). در حالی که در پژوهش‌های که از qRT-PCR استفاده شده است، خون افراد نرمال و لوسمی‌های مزمن از نظر بیان SVV مثبت گزارش شده است (۲۶). از این رو در این بحث، بیشتر از مقاله‌هایی استفاده شده است که از طریق qRT-PCR، بیان SVV را بررسی کرده‌اند. هم چنین ژن SVV (birc5) ۵ ایزوفرم دارد که بیان این ایزوفرم‌ها در سرطان‌های گوناگون متفاوت می‌باشد و آخرین ایزوفرم در سال ۲۰۰۵ شناخته شده است. به این ترتیب برخی از مقاله‌هایی که قبل از ۲۰۰۵ منتشر شده‌اند به جای بررسی بیان ایزوفرم SVV، بیان کل ژن SVV یا ترکیبی از چند ایزوفرم را گزارش کرده‌اند (۲۸، ۲۷، ۲۴).

مطابق گزارش‌های گوناگونی که بیان SVV را در سرطان‌های گوناگون معنی‌دار گزارش کرده بودند، در این مطالعه نیز برای اولین بار نشان داده شد که بیان SVV به صورت معنی‌داری در بیماران APL بالا می‌رود (شکل ۳) (۱۴). این گزارش با برخی گزارش‌های قبلی در AML یا APL متفاوت است. به این صورت که در این گزارش‌ها بیان SVV در AML و APL را پایین یا بدون معنی (not significant) گزارش کرده‌اند (۳۰-۲۸، ۲۴). این تفاوت در گزارش‌ها ممکن است به خاطر عوامل زیر باشد: ۱) مقدار نمونه: گزارش‌های قبلی اکثراً روی AML انجام شده نه APL و مقدار نمونه APL نیز بسیار کم بوده است اما در این پژوهش بیان SVV فقط روی بیماران APL و در تعداد نمونه زیاد بررسی شد. ۲) روش بررسی: اکثر گزارش‌های قبلی بر اساس روش‌هایی غیر از qRT-PCR بوده است که حساسیت و اختصاصیت این روش‌ها متفاوت می‌باشد. ۳) بررسی بیان SVV در سطوح گوناگون پروتئین و RNA هم می‌تواند موجب این تفاوت‌ها شود.

در بعضی پژوهش‌ها روی نمونه‌های AML، بیان SVV نسبت به خون نرمال معنی‌دار گزارش شده است و نشان داده شده که بیان SVV می‌تواند به عنوان یک فاکتور منفی برای پیش‌آگهی‌های بیماران (survival prognosis) باشد (۳۲، ۳۱، ۲۵).

در مقاله‌هایی که از خون یا نمونه مغز استخوان افراد سالم به عنوان کنترل استفاده شده است، تنها در مواردی که از qRT-PCR استفاده شده بیان مثبت اما کم و در بقیه موارد اکثراً بیان SVV منفی گزارش شده است (۳۰-۲۸، ۲۵). در این پژوهش از خون افراد سالم استفاده شد که بیان پایین SVV در این افراد مشاهده گردید.

فرار از آپوپتوز یکی از نشانه‌های اصلی سرطان می‌باشد و از پروتئین‌های IAP، SVV یکی از پروتئین‌های مهم در مهار آپوپتوز و حفظ بقای سلول سرطانی است که در اکثر سرطان‌ها بیان آن بالا می‌رود (۳۳، ۲۱، ۱۴). در این بررسی بیان ژن SVV در گروه تشخیص به صورت قابل توجهی بالا بود و در گروه بهبود پس از استفاده از داروی آرسنیک تری اکساید، بیان به طور معنی‌داری نسبت به گروه تشخیص پایین آمد ($p < 0.01$). این یافته‌ها نشان می‌دهد که SVV در حفظ سلول سرطانی APL نقش دارد و یکی از سازوکارهای احتمالی القای آپوپتوز توسط آرسنیک تری اکساید می‌تواند کاهش بیان این ژن باشد.

SVV به عنوان یکی از پروتئین‌های IAPs، نقش منحصر به فردی را در مهار آپوپتوز و تقسیم سلولی ایفا می‌کند و در بعضی سرطان‌ها دیده شده بیان بالای SVV با عود بیماری همراه است (۴۱-۳۴). پژوهشی در بیماران CML در دو فاز chronic phase و blast crisis نشان داد که بیان SVV به طور معنی‌داری در blast crisis بالا می‌رود (۴۲). در این پژوهش نیز از کل خون برای بررسی بیان استفاده شده بود. در تومورهای جامد هم دیده شده که در بعضی سرطان‌ها، بیان SVV با درجه و مرحله سرطان هماهنگی دارد (۴۶-۴۳). در این پژوهش تفاوتی بین بیان SVV در تشخیص و عود دیده نشد، البته زمان نمونه‌گیری می‌تواند در نتیجه تاثیر بگذارد. علاوه بر آن در مطالعه‌های قبلی در تومورهای جامد یا لوسمی‌ها مانند CML، مرحله‌بندی (staging) مشخصی وجود دارد و این

نمونه‌های عود نسبت به هم تفاوت داشته باشند.

نتیجه‌گیری

اگر چه ساز و کار دقیق اثر ژن SVV در مقاومت به آپوپتوز و شیمی‌درمانی مشخص نیست، اما این مطالعه نشان داد که SVV ممکن است در پاتوفیزیولوژی APL نقش داشته باشد و یکی از سازوکارهای اثر آرسنیک تری‌اکساید روی سرطان APL می‌تواند کاهش بیان SVV باشد. بررسی‌های بیشتری نیاز است تا نقش دقیق این ژن در سرطان APL مشخص شود. هم‌چنین این پژوهش نشان داد که می‌توان از ژن SVV به عنوان مارکر پی‌گیری استفاده کرد. افزایش اطلاعات طی مطالعه‌های آینده درباره مکانیسم‌های دقیق آرسنیک تری‌اکساید، می‌تواند ما را در بهینه‌سازی اثرات درمانی و در عین حال کاستن از توکسیسیتی و اثرات جانبی آن یاری کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش جزئی از طرح مصوب مرکز خون، هماتولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی بود. از پرسنل زحمت‌کش و دلسوز آزمایشگاه این مرکز به ویژه خانم‌ها نسرين علیزاد، زهرا خرمیان و رباب ابراهیمی که در جمع‌آوری نمونه بیماران همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References :

- 1- Ribeiro R, Rego E. Management of APL in developing countries: Epidemiology, challenges and opportunities for international collaboration. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 162-8.
- 2- Kasper DL, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Fauci AS. editors. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill; 2005.
- 3- Ziaei JE. High frequency of acute promyelocytic leukemia in northwest Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(2): 188-9.
- 4- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008; 111(5): 2505-15.
- 5- Lo -Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006; 156-61, 514.
- 6- Sanz MA. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. Hematology 2006; 1:147.
- 7- Sanz M, Tallman M, Lo-Coco F. Practice points, consensus, and controversial issues in the management of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Oncologist 2005; 10(10): 806-14.
- 8- De Botton S, Sanz M, Chevret S, Dombret H, Martin G, Thomas X, et al. Extramedullary relapse in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. Leukemia 2005; 20(1): 35-41.
- 9- Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH, Rostami S, Jahani M, Hosseini R, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide without ATRA and/or chemotherapy. Ann Oncol 2006; 17(1): 131-4.
- 10- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001 Nov 1; 414(6859): 105-11.
- 11- Fulda S. Cell death in hematological tumors. Apoptosis 2009; 14(4): 409-23.
- 12- Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? Mol Cell 2008; 30(2): 123-35.
- 13- Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. Leukemia 2008; 23(3): 467-76.
- 14- Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. Mol Cancer Ther 2006; 5(5): 1087-98.

- 15- Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(1): 61-70.
- 16- Altieri D. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine* 2001; 7(12): 542-7.
- 17- Cong XL, Han ZC. Survivin and leukemia. *Int J Hematol* 2004; 80(3): 232-8.
- 18- Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Vogel C, *et al.* Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999; 23(4): 387-8.
- 19- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22(53): 8581-9.
- 20- Yamamoto H, Ngan C, Monden M. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* 2008; 99(9): 1709-14.
- 21- Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(1): 46-54.
- 22- Carter B, Andreeff M. Targeting survivin in leukemia. *Oncology Reviews* 2008; 1(4): 195-204.
- 23- Guha M, Altieri D. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle* 2009; 8(17): 2708-10.
- 24- Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E. Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Hematol* 2002; 75(2): 161-5.
- 25- Wagner M, Schmelz K, Wuchter C, Ludwig WD, Dorken B, Tamm I. In vivo expression of survivin and its splice variant survivin-2B: impact on clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Int J Cancer* 2006; 119(6): 1291-7.
- 26- Conte E, Stagno F, Guglielmo P, Scuto A, Consoli C, Messina A. Survivin expression in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett* 2005; 225(1): 105-10.
- 27- Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer* 2005; 4(1): 11.
- 28- Nakagawa Y, Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Abe S, Inoue M, *et al.* Expression of IAP-family proteins in adult acute mixed lineage leukemia (AMLL). *Am J Hematol* 2005; 78(3): 173-80.
- 29- Invernizzi R, Travaglino E, Lunghi M, Klersy C, Bernasconi P, Cazzola M, *et al.* Survivin expression in acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2004; 45(11): 2229-37.
- 30- Invernizzi R, Travaglino E, Benatti C, Malcovati L, Della Porta M, Cazzola M, *et al.* Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2006; 76(6): 494-501.
- 31- Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, *et al.* Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111(1): 196-203.
- 32- Sugahara K, Uemura A, Harasawa H, Nagai H, Hirakata Y, Tomonaga M, *et al.* Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias. *Int J Hematol* 2004; 80(1): 52-8.
- 33- Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
- 34- Skagias L, Politi E, Karameris A, Sambaziotis D, Archondakis A, Ntinis A, *et al.* Survivin expression as a strong indicator of recurrence in urothelial bladder cancer. Predictive value of nuclear versus cytoplasmic staining. *Anticancer Res* 2009; 29(10): 4163-7.
- 35- Fang YJ, Lu ZH, Wang GQ, Pan ZZ, Zhou ZW, Yun JP, *et al.* Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24(8): 875-84.
- 36- Yie SM, Lou B, Ye SR, Cao M, He X, Li P, *et al.* Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(11): 3073-82.
- 37- Rebhun RB, Lana SE, Ehrhart EJ, Charles JB, Thamm DH. Comparative analysis of survivin expression in untreated and relapsed canine lymphoma. *J Vet Intern Med* 2008; 22(4): 989-95.
- 38- Ye CP, Qiu CZ, Huang ZX, Su QC, Zhuang W, Wu RL, *et al.* Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13(46): 6264-8.
- 39- Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer* 2006; 94(2): 253-8.
- 40- Poetker DM, Sandler AD, Scott DL, Smith RJ, Bauman NM. Survivin expression in juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111(11): 957-61.
- 41- Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999; 341(6): 452-3.
- 42- Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B, Vela MC, Colomer D, Alvarez-Larran A, Cervantes F. Survivin expression in the progression of chronic myeloid leukemia: a sequential study in 16 patients. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(5): 717-22.
- 43- Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002; 184(1): 105-16.
- 44- Okamura K, Koike H, Sekine Y, Matsui H, Suzuki K. Survivin and its spliced isoform gene expression is associated with proliferation of renal cancer cells and clinical stage of renal cancer. *Cancer Epidemiol* 2009; 33(2): 137-41.
- 45- Ulukus EC, Kargi HA, Sis B, Lebe B, Oztup I, Akkoclu A, *et al.* Survivin expression in non-small-cell lung carcinomas: correlation with apoptosis and other apoptosis-related proteins, clinicopathologic prognostic factors and prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15(1): 31-7.
- 46- Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 2007; 109(6): 1106-13.

Original Article

Expression analysis of Survivin gene in acute promyelocytic leukemia at diagnosis and after treatment

Nouri Dalouyi M.R.¹, Zaki dizaji M.¹, Khavandi S.², Rostami Sh.³, Yeseri M.¹, Alimoghaddam K.³, Ghavamzadeh A.³, Ghaffari S.H.³

¹Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Islamic Azad University, Tabriz Medical Branch, Tabriz, Iran

³Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Survivin (SVV) is an inhibitor of apoptosis. Its expression rises in most cancer types and is associated with resistance to chemotherapy, increased recurrence, and decreased patient survival. In this study, the expression of SVV gene was analyzed in APL (Acute Promyelocytic Leukemia) patients.

Materials and Methods

In this case-control study, the blood samples of 50 patients were collected in three groups; diagnosis, remission, and recurrence. Then, SVV gene expression was studied using absolute quantitative real time PCR. The data were analysed with SPSS version 17, Kruskal-Wallis and Tukey tests.

Results

For the first time, this study demonstrated that SVV overexpressed significantly in APL patients compared with the control (Mean $\pm$ SD; 910.5 ± 699) ($p < 0.01$). This overexpression was seen both in diagnosis (4981.4 ± 4112.2) and recurrence groups (4584.2 ± 5133.6) (both $p < 0.01$). After arsenic trioxide therapy (ATO) the SVV expression declined significantly as compared to the diagnosis group ($p < 0.01$).

Conclusions

Findings indicate that SVV may have a role in survival of APL cells and induction of apoptosis by decreasing SVV expression can be a probable mechanism of ATO. This study indicates that the SVV may be used as a biomarker in APL patients during the course of the disease.

Key words: Leukemia, Promyelocytic, Acute, Arsenic trioxide, Remission Induction, Recurrence
Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8 (1): 10-19

Received: 16 Oct 2010

Accepted: 23 Nov 2010

Correspondence: Ghaffari SH., PhD. Associate professor. Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Street.
Postal code: 14111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902665; Fax : (+9821) 88004140
E-mail: shghaffari@tums.ac.ir