خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۴ زمستان ۹۵ (۳۲۳-۳۱۴)

مقاله پژوهشی

القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش درصد Sub-G_1 متعاقب تیمار سلول‌های Nalm-6 با مهارکننده سنتتیک hTERT

محدثه زارعی[1]، داوود بشاش[2]

چکیده

سابقه و هدف

به دلیل نقش تلومراز در تکثیر نامحدود اکثر سلول‌های سرطانی از جمله بدخیمی‌های خونی، مهار تلومراز به عنوان روش مناسبی جهت درمان سرطان‌ها مطرح می‌باشد. هدف از مطالعه، بررسی اثر BIBR1532 که یک مهارکننده سنتتیک hTERT می‌باشد، بر روی فعالیت متابولیک، میزان ساخت DNA ، تغییرات چرخه سلولی و بیان ژن‌های *p21*، *p73*، *Bax* و *Bad* در سلول‌های Nalm-6 (رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد) بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی به منظور بررسی اثر BIBR1532 ، سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلف دارو کشت داده شدند و متعاقباً آزمون‌های BrdU cell proliferation assay ، Microculture Tetrazolium Test، Flowcytometeric cell cycle arrest و Quantitative real-time انجام شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان داد که BIBR1532 دارای اثر مهاری بر فعالیت متابولیک و ساخت DNA سلول‌های رده Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان می‌باشد. هم چنین نتایج حاکی از افزایش بیان mRNA ژن‌های *Bad* ، *Bax* ، *p73* و *p21* بود که خود متعاقباً با توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش مرحله Sub-G_1 همراه می‌باشد.

نتیجه گیری

از آن جایی که تیمار با داروی BIBR1532 در رده سلولی Nalm-6 سبب القاء توقف چرخه سلولی و فعال شدن مسیر آپوپتوز می‌گردد، لذا می‌توان از افزوده شدن درمان‌های مبتنی بر داروهای آنتی‌تلومراز به عنوان یک استراتژی جدید در درمان مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستیک حاد بهره جست.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، BIBR1532 ، تلومراز

تاریخ دریافت : ۹۴/۱۱/۱۴
تاریخ پذیرش : ۹۵/۶/۱۷

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ گروه هماتولوژی ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ گروه هماتولوژی ـ میدان قدس ـ خیابان دربند ـ تهران ـ ایران ـ کدپستی: ۱۹۷۱۶۵۳۳۱۲

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL)، شایع‌ترین سرطان دوران کودکی بوده و حدود ۳۰٪ از سرطان‌های این دوران را به خود اختصاص می‌دهد. هر چند بیشترین شیوع ALL مربوط به سنین ۲ تا ۵ سال می‌باشد، با این حال، احتمال ابتلا به این لوسمی در افراد جوان و مسن نیز وجود دارد(۱). علی‌رغم میزان بالای پاسخ به درمان در این بیماری، مقاومت به درمان‌های متداول و عود بیماری، هم چنان به عنوان یک معضل مهم مطرح است(۲). بدیهی است که درک کامل مکانیسم‌هایی که سبب مقاومت در برابر داروهای شیمی‌درمانی می‌شوند، می‌توانند سبب معرفی درمان‌های جدید در این بیماری شود(۳). اگر چه ماهیت کلینیکی سرطان‌ها بسیار هتروژن می‌باشد، اما اکثر تومورها در تعداد محدودی از ویژگی‌ها هم چون توانایی تکثیر نامحدود، رشد غیر قابل کنترل، تهاجم به بافت‌ها و انتشار متاستاتیک مشترک هستند(۴). بسیاری از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که کسب توانایی تکثیر نامحدود در سلول‌های سرطانی که عمدتاً ناشی از فعالیت آنزیم تلومراز است، مهم‌ترین مرحله در پیشرفت سرطان می‌باشد(۵). تلومراز، آنزیمی است که بعد از همانندسازی فعال شده و باعث افزودن تعداد نسبتاً زیادی نوکلئوتید به انتهای کروموزوم‌ها می‌شود. این آنزیم که یک کمپلکس چند پروتئینی با ساختار ریبونوکلئوپروتئین است، دارای فعالیت ترانس کریپتاز معکوس(RT) بوده و قادر است از روی RNA ، مولکول DNA تولید کند(۸-۶). مشخص شده است که آنزیم تلومراز در ۹۰٪ از بدخیمی‌ها افزایش بیان دارد، این در حالی است که در سلول‌های نرمال این آنزیم بیان نشده و غیرفعال می‌باشد. مطالعه‌های بسیاری نشان می‌دهد که هدف قرار دادن فعالیت تلومراز در بسیاری از تومورها سبب تداخل در عملکرد تلومر و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود(۹)؛ از این رو می‌توان از مهارکننده‌های تلومراز به عنوان اهداف درمانی امیدوار کننده در مهار رشد و تکثیر سرطان بهره جست.

در میان این دسته از داروها، BIBR1532 به عنوان مهارکننده اختصاصی hTERT توجه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است(۱۰). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که مهار تلومراز با استفاده از BIBR1532 در بسیاری از سلول‌های سرطانی هم چون پروستات، پستان، ریه و فیبروسارکوما منجر به کاهش طول تلومر و القاء مرگ سلولی می‌شود(۱۱). هم چنین اثر سایتوتوکسیک مستقیم این دارو در کوتاه مدت، بدون تاثیر بر سلول‌های نرمال، بر روی سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد و لوسمی لنفوئیدی مزمن نیز به صورت وابسته به دوز و زمان نشان داده شده است(۱۲). نتایج حاصل از مطالعه اخیر توسط شی و همکاران نشان داد که استفاده از این دارو در سرطان سینه سبب القاء آپوپتوز از طریق مهار تلومر و توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 می‌شود(۱۳). با توجه به این که مشخص شده است که بیان آنزیم تلومراز در مبتلایان به ALL افزایش دارد، لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا کارآیی استراتژی مبتنی بر استفاده از داروهای آنتی‌تلومراز را در رده سلولی Nalm-6 (Pre-B ALL cell) بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تیمار دارویی:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های Nalm-6 (سلول‌های رده لوسمی لنفوبلاستیک حاد) به صورت سوسپانسیون در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۲ میلی‌مولار از ال-گلوتامین، ۱۰٪ FBS ، پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ U/mL و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ µg/mL در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ از CO_2 کشت داده شدند. برای تیمار دارویی سلول‌ها از داروی BIBR1532 (آمریکا-بیوسانس) که به صورت پودر می‌باشد، استفاده شد. محلول ذخیره BIBR1532 در غلظت ۱ mM و به واسطه حل کردن این دارو در DMSO استریل تهیه شد. محلول ذخیره را در میکروتیوب‌ها تقسیم کرده و آن‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری کردیم. به منظور تعیین اثرات بهینه BIBR1532 ، دو متغیر دوز و زمان در نظر گرفته شد؛ بدین ترتیب که سلول‌های سرطانی Nalm-6 با غلظت‌های ۱۰، ۳۰ و ۶۰ میکرومولار از دارو طی مدت زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. در این مطالعه، سلول‌های تیمار نشده با دارو به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده است. در ضمن به منظور افزایش بهره‌وری کار

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

و بررسی مقایسه‌ای، تمامی آزمایش‌ها برای هر دوز و زمان به صورت تریپلیکیت انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی:

برای بررسی اثر مهاری داروی BIBR1532 بر روی فعالیت متابولیک سلولی، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر در حضور یا عدم حضور دارو به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

بعد از اتمام زمان تیمار، محلول MTT در غلظت 5mg/mL به سلول‌های درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۳ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، پلیت حاوی سلول‌ها با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. در ادامه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان ساخت DNA:

اثر مهاری BIBR1532 بر روی تکثیر سلول‌های Nalm-6 از طریق تعیین میزان مشارکت برموداکسی‌یوریدین در DNA سلول‌های Nalm-6 با استفاده از BrdU-based cell proliferation ELISA kit طبق دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک درون پلیت ۹۶ تایی در حضور یا عدم حضور BIBR1532 کشت داده شدند. ۱۲ ساعت مانده به انتهای زمان انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر محلول BrdU که در کیت موجود می‌باشد، به سلول‌ها افزوده شد؛ در ادامه و با استفاده از محلول FixDenat ، سلول‌ها فیکس شده و DNA آن‌ها دناتوره گشت. سلول‌ها با آنتی‌بادی علیه BrdU که با آنزیم پراکسیداز کنژوگه می‌باشد، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و در انتهای این زمان، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و آن هم به منظور پایان دادن به عملکرد آنزیم پراکسیداز، از محلول اسید سولفوریک ۱ مولار استفاده شد. در انتها، میزان رنگ ایجاد شده در هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج nm ۴۵۰ خوانده شد. در نهایت و برای محاسبه اثر مهاری BIBR1532 بر روی تکثیر و بررسی میزان کاهش ساخت DNA سلول‌های Nalm-6 تیمار شده از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد ساخت DNA} = \frac{\text{OD exp}}{\text{OD cont}} \times ۱۰۰$$

در این فرمول، OD exp و OD cont به ترتیب بیانگر جذب نوری سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌باشد.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

برای استخراج RNA از محلول TriPure Isolation (رُوش) Reagent طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های Nalm-6 با BIBR1532 و متعاقب گذشت ۲۴ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. در ادامه کار، برای انجام واکنش رونویسی معکوس و جهت ساخت cDNA از (فرمنتاز) RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد.

حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ µL بود و محتویات آن شامل ۴ µL از بافر 5X PCR، ۲ µL از dNTP ، ۱ µL از راندم هگزامر، ۱ µL آب تیمار شده با DEPC ، ۱ µL مهار کننده RNase (۲۰ U/µL)، ۱ µL ترانس کریپتاز معکوس M-MULV (۲۰۰ U/µL) و ۱ µg از RNA مورد آزمایش به ازای هر واکنش می‌باشد.

محتوی مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت، واکنش ساخت cDNA به واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایان پذیرفت. cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real-time PCR

ژن	آغازگر جلوبرنده (5'-3')	آغازگر معکوس (5'-3')	سایز (bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
p21	CCTGTCACTGTCTTGTACCCT	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	۱۳۰
p73	GTCAAGCCGGGGGAATAATGA	CTCAGCAGATTGAACTGGGC	۱۰۸
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲
Bad	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	CCCATCCCTTCGTCGTCCT	۲۴۹

اندازه‌گیری کمی بیان ژن‌ها با روش Real-time PCR:

آزمایش Real-time PCR در دستگاه Light-cycler (رُوش) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ µL از SYBR Premix Ex Taq (تاکارا)، ۲ µL از cDNA ، ۰/۵ µL از هریک از آغازگرها(۱۰ pmol) و ۷ µL آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۵ چرخه برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. هم‌زمان HPRT (هاپیوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز) برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد(جدول ۱).

بررسی فعالیت چرخه سلولی:

ابتدا تعداد 10^6 سلول به همراه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ FBS ، در چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای ریخته شد. در ادامه، سلول‌ها با دوزهای ۱۰، ۳۰ و ۶۰ میکرومولار از داروی BIBR1532 تیمار و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، سلول‌ها را با دور ۲۰۰۰ rpm/min سانتریفیوژ کرده و در محلول PBS معلق نمودیم. سپس سلول‌ها به وسیله اتانول ۷۰٪ تثبیت شدند و در ادامه پس از افزودن ۱ mL محلول PI master mix که حاوی ۹۵۰ µL از PBS و ۴۰ µL از معرف PI می‌باشد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت، الگوی رنگ‌پذیری DNA با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفته و داده‌ها با استفاده از نرم افزار WINMDI آنالیز شدند.

آنالیز آماری:

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. اختلاف معنادار بین متغیرهای آزمایش با استفاده از آزمون t دو دامنه تعیین شد. هم چنین به منظور مقایسه بین گروه کنترل و نمونه‌های آزمایش شده از آزمون دانت استفاده گردید. مقادیر $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شده است.

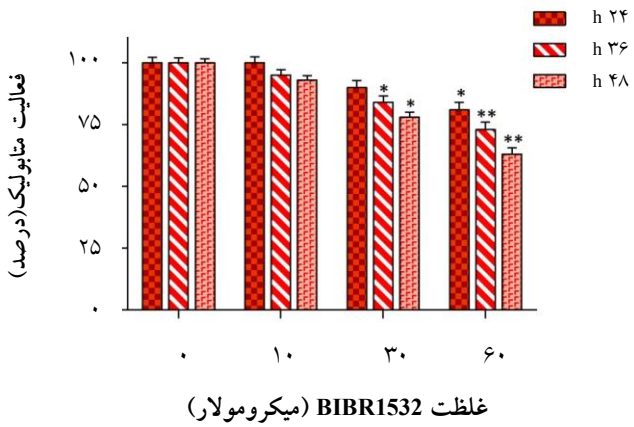
یافته‌ها

BIBR1532 به صورت وابسته به دوز و زمان باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 می‌شود:

به منظور بررسی اثر BIBR1532 بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 از روش MTT استفاده شد. طی بررسی‌های صورت گرفته بر روی سلول‌های تیمار شده، در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت مشخص گردید که داروی BIBR1532 سبب کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌شود. در سلول‌های تیمار شده، با افزایش غلظت داروی BIBR1532 فعالیت متابولیک سلول‌ها به صورت وابسته به دوز کاهش می‌یابد. هم چنین نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش زمان مواجهه سلول‌ها با دارو نیز میزان تاثیرگذاری سایتوتوکسیک این مهارکننده

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

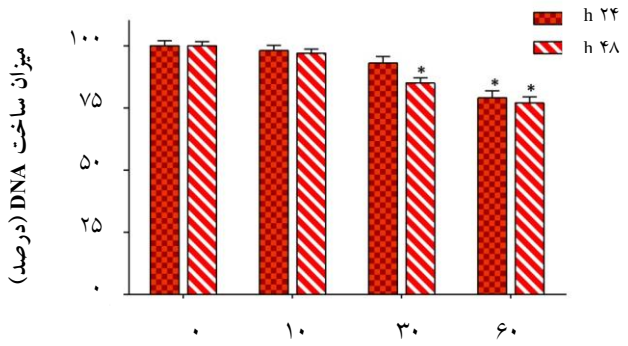
تشدید می‌شود. غلظت ۱۰ µM دارو اثر چشمگیری در کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های Nalm-6 ندارد، این در حالی است که دوز ۳۰ µM از دارو طی مدت زمان ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت به ترتیب این شاخص را به ۹۰٪، ۸۴٪ و ۷۸٪ کاهش می‌دهد(نمودار ۱). هم چنین با افزایش غلظت دارو به ۶۰ µM شاهد کاهش بیشتر فعالیت متابولیک به ترتیب به میزان ۸۱٪، ۷۳٪ و ۶۳٪ در زمان‌های ذکر شده بودیم. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که داروی BIBR1532 هم به طور وابسته به دوز و هم به طور وابسته به زمان سبب مهار فعالیت متابولیکی سلول‌های Nalm-6 می‌شود.



نمودار ۱: بررسی اثر BIBR1532 بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌های Nalm-6 در تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ای تحت تأثیر مقادیر مختلف BIBR1532 قرار گرفته و به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه و p value به دست‌آمده(* ، بیانگر p< ۰/۰۵ و و **، بیانگر p< ۰/۰۱) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

BIBR1532 به طور وابسته به دوز و زمان سبب کاهش ساخت DNA می‌شود:

به منظور بررسی اثر آنتی‌پرولیفراتیو داروی BIBR1532 بر روی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد Nalm-6 ، از آزمون BrdU استفاده شد. طی بررسی‌های وابسته به دوز در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با داروی BIBR1532 بر روی سلول‌های Nalm-6 ، مشخص گردید که این دارو هم به طور وابسته به دوز و هم وابسته به زمان سبب مهار تکثیر سلول‌های Nalm-6 می‌گردد. در غلظت ۳۰ µM از دارو، میزان ساخت DNA و تکثیر سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۷ و ۱۵ درصد کاهش یافت(نمودار ۲). در همین راستا، به ترتیب کاهش ۲۱ و ۲۳ درصدی میزان ساخت DNA در غلظت ۶۰µM در زمان‌های مذکور، بیانگر اثر آنتی‌پرولیفراتیو وابسته به دوز و زمان دارو می‌باشد(نمودار ۲). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که BIBR1532 علاوه بر اعمال اثر سایتوتوکسیک مشخص شده در آزمون MTT ، دارای خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو نیز است.



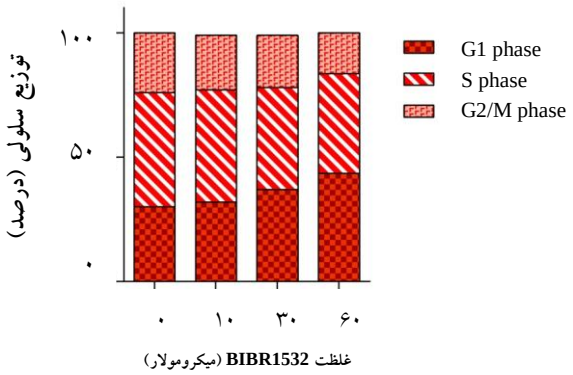
نمودار۲: اثر داروی BIBR1532 بر روی ساخت DNA در رده سلولی Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌های Nalm-6 در تعداد ۵۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ای تحت تأثیر مقادیر مختلف BIBR1532 قرار گرفته و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه و p value به دست‌آمده (*، بیانگر p< ۰/۰۵) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

BIBR1532 موجب توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش جمعیت سلولی در $Sub\text{-}G_1$ می‌شود:

برای تعیین این که آیا اثر مهاری داروی BIBR1532 می‌تواند منسوب به تغییرات در چرخه سلولی باشد، سلول‌های Nalm-6 با دوزهای ۱۰ µM، ۳۰ µM و ۶۰ µM برای ۲۴ ساعت تیمار داده شده و با استفاده از روش

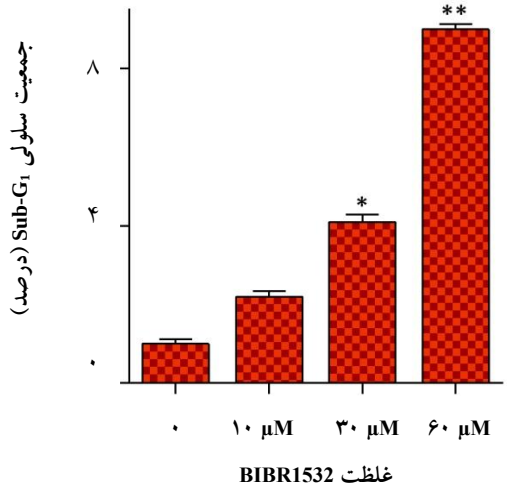
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که در سلول‌های Nalm-6 افزایش غلظت BIBR1532 موجب افزایش مختصر درصد سلول‌ها در مرحله G_1 می‌شود(نمودار ۳). بدین ترتیب که درصد سلول‌ها در مرحله G_1 در گروه کنترل ۳۰٪ و در دوزهای ۱۰µM ، ۳۰ µM و ۶۰ µM طی تیمار ۲۴ ساعته به ترتیب ۳۲٪ ، ۳۷٪ و ۴۳٪ می‌باشد. هم چنین، نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که دوز ۶۰ µM از دارو سبب کاهش معنادار جمعیت سلولی در مرحله G_2/M نیز می‌شود؛ به طوری که تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با کاهش ۵۰ درصدی سلول‌های این مرحله نسبت به جمعیت سلولی فاز G_2/M در گروه کنترل همراه می‌باشد.



نمودار ۳: BIBR1532 سبب توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و کاهش جمعیت سلولی G_2/M می‌شود. افزایش درصد سلول‌های Nalm-6 در مرحله G_1 و هم چنین کاهش معنادار جمعیت سلول‌های مرحله G_2/M طی تیمار ۲۴ ساعته با داروی BIBR1532 نشان‌دهنده اعمال اثر مهاری دارو در الگوی چرخه سلولی می‌باشد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست‌آمده (*، بیانگر ۰/۰۵ >p و **، بیانگر ۰/۰۱ >p) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

علاوه بر این، درصد سلول‌های وارد شده به مرحله $Sub\text{-}G_1$ که بیانگر سلول‌های آپوپتوتیک است نیز به طور قابل توجه و آن هم به طور وابسته به دوز افزایش یافته است(نمودار ۴). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که اثرات مهاری اعمال شده توسط داروی BIBR1532 در رده سلولی Nalm-6 احتمالاً از طریق فعال کردن مسیر آپوپتوتیک می‌باشد.



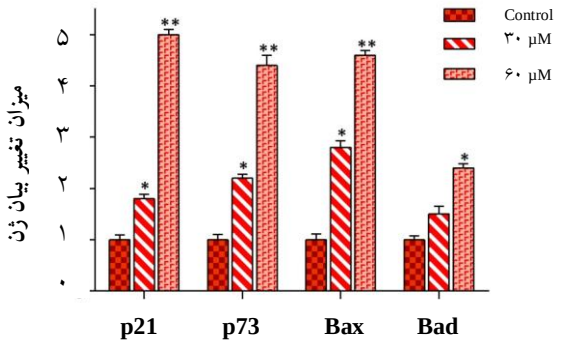
نمودار ۴: BIBR1532 جمعیت سلولی $Sub\text{-}G_1$ را افزایش می‌دهد. افزایش این پیک به منزله افزایش آپوپتوز در سلول‌ها تلقی شده و می‌توان نتیجه گرفت که داروی BIBR1532 به طور وابسته به دوز سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های Nalm-6 می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده(*، بیانگر ۰/۰۵ >p و **، بیانگر ۰/۰۱ >p) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

با افزایش غلظت BIBR1532 میزان رونویسی از ژن‌های پروآپوپتوتیک Bad ، Bax ، p73 و p21/افزایش می‌یابد:

به منظور آن که بدانیم آیا اثر سایتوتوکسیک دارو از طریق فعال شدن مسیر آپوپتوز رخ می‌دهد، میزان فعالیت رونویسی برخی از ژن‌های پروآپوپتوتیک مهم هم چون Bad ، Bax ، p73 و p21 اندازه‌گیری شد. تیمار سلول‌های Nalm-6 با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میکرومولار BIBR1532 طی مدت زمان ۲۴ ساعت، به طور چشمگیری سبب افزایش بیان mRNA ژن‌های *p73* ، *p21* ، *Bad* و *Bax* می‌شود(نمودار ۵). نتایج حاصل نشان داد که غلظت ۶۰ میکرومولار دارو سبب افزایش ۵ برابری رونویسی از ژن *p21* و هم چنین افزایش تقریباً ۴/۵ برابری mRNA ژن‌های *Bax* و *p73* شد. با توجه به نتایج داده‌ها می‌توان نتیجه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

گرفت که داروی BIBR1532 به طور وابسته بـه دوز سـبب افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک می‌شود.



نمودار ۵: افزایش میزان رونویسی از ژن‌های پروآپوپتوتیک Bad ، Bax ، p73 و p21 طی تیمار با BIBR1532. سلول‌های Nalm-6 با دوزهای معین از BIBR1532 (۳۰ µM و ۶۰ µM) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. در ادامه و بعد از استخراج RNA و ساخت cDNA ، میزان بیان mRNA هر یک از ژن‌ها با استفاده از روش RQ-RT-PCR اندازه‌گیری شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر ۰/۰۵ >p و **، بیانگر ۰/۰۱ >p) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث

مطالعه‌ها نشان داده است که p73 می‌توانـد بـه ژن‌هـای هدف p53 متصل شـده و بـه واسـطه فعـال کـردن برخـی ژن‌هـای پروآپوپتوتیـک هـدف مثـل Bax و p21 ، سـبب افزایش مرگ برنامه‌ریـزی شـده در سـلول شـود(۱۴). هـم چنین مشخص شده است که p21 خود نیـز بـه عنـوان یـک کیناز مهارگر وابسته به چرخه سلولی، در هنگام القاء آسیب به DNA سلول افزایش یافته و سبب مهار چرخه سلولی در مرحله G_1 می‌شود(۱۶، ۱۵). بـا تـوجه بـه ایـن نکتـه کـه تکثیر نامحدود سلول‌ها، که عمدتـاً از طریـق حفـظ طـول تلومر اتفاق می‌افتد، مشخصه اصلی بسیاری از سـرطان‌هـا است، لذا امروزه هـدف قـرار دادن مکانیسـم‌هـای مسـئول حفظ طول تلومر به عنوان یک هدف درمانی خـاص مـورد توجه وافر قرار گرفتـه اسـت(۵). در ایـن مطالعـه و بـرای ارزیابی اثر BIBR1532 در لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL) و هـم چنـین جهـت درک مکانیسـم دقیقـی از سایتوتوکسیسیتی این دارو، سـلول‌هـای Nalm-6 مشـتق از pre-B ALL با غلظت‌های مختلف از این مهارکننـده تیمـار شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشـخص گردیـد که بر خـلاف دوز پـایین دارو(۱۰ µM) کـه طـی گذشـت مدت زمان کوتاه قادر به مهار رشد و کاهش درصد زنـده-مانی سـلول‌هـا نمـی‌باشـد، دوزهـای بـالای دارو (≤ ۳۰ میکرومولار) قادرند بر روی درصد زنده‌مانی و هـم چنـین قدرت تکثیر سلول‌ها تاثیر مهاری قابل ملاحظه‌ای بگذارند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که مهار تلومراز با استفاده از داروی BIBR1532در بسیاری از سلول‌هـای سـرطانی هـم چـون پستان، ریه، کندروسارکوما و لوسـمی پرومیلوسـتیک حـاد منجـر بـه کـاهش طـول تلـومر و القـاء مـرگ سـلولی می‌شود(۲۱–۱۷). الدالی و همکارانش نیز مشخص کردنـد که اگر چه BIBR1532 دارای اثر آنتی پرولیفراتیـو بـر روی سلول‌های بیماران مبتلا به AML و CLL و همین طور سل لاین‌های مشتق شده از این بیماری‌ها می‌باشد، اما بـر روی سلول‌های طبیعی هماتوپوئتیـک هـیچ اثـر سایتوتوکسـیکی نداشت(۱۲).

نتایج حاصل از ایـن مطالعـه هـم چنـین نشـان داد کـه BIBR1532 مـی‌توانـد الگـوی چرخـه سـلولی را در رده سـلولی Nalm-6 تغییـر دهـد؛ بـدین ترتیـب کـه افـزایش جمعیت سلولی در فـاز $Sub\text{-}G_1$ متعاقـب تیمـار سـلول‌هـا، بیانگر القاء آپوپتوز و کاهش سلول‌های G_2/M تائیدی بر اثر آنتی‌پرولیفراتیو دارو می‌باشد. شـی و همکـاران نیـز نشـان دادنـد کـه اسـتفاده هـم زمـان از داروی BIBR1532 و Paclitaxel سبب افزایش آپوپتوز و کاهش پرولیفراسیون در سلول‌های سرطانی سینه می‌شود؛ با توجه به نتـایج حاصـل از این مطالعه نشان داده شد کـه اسـتفاده از BIBR1532 در سرطان سینه سبب القـاء آپوپتـوز از طریـق مهـار تلـومر و تـوقف چرخه سلولی در مرحلـه G_1 (مسـتقل از وضـعیت ER ، HER-2 و p53) مـی‌شـود(۱۳). هـم چنـین طـی مطالعه‌های صورت گرفتـه بـر روی سـلول‌هـای سـرطانی اندومتریال مشخص شده است که ایـن مهـار کننـده سـبب القاء آپوپتـوز و جلـوگیری از متاسـتاز ایـن سـلول‌هـا نیـز می‌شود(۲۲).

در مـواقعـی که آسیب DNA شدید باشد، سلول آسیب

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

دیده از طریق راه‌اندازی مسیر آپوپتوز خود را تخریب می‌کند. تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد p73 که از جمله اعضاء خانواده p53 می‌باشد، دارای نقش کلیدی در فعال کردن مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌باشد(۱۵). در واقع، متعاقب بروز آسیب DNA ، فاکتور رونویسی p73 می‌تواند با اتصال به DNA برخی از ژن‌های پروآپوپتوتیک هم چون Bax و p21 سبب فعال شدن مسیر آپوپتوتیک در سلول شود(۱۵، ۱۰). به‌علاوه گزارش شده است که p73 می‌تواند با محدود کردن میزان رونویسی از ژن *hTERT* منجر به مهار فعالیت آنزیم تلومراز نیز گردد(۱۶، ۱۴). هم چنین p21نیز که یک فاکتور رونویسی شناخته شده وابسته به p53 می‌باشد، می‌تواند با القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و یا القاء آپوپتوز، مقدمات مربوط به ترمیم DNA و یا تخریب سلول آسیب‌دیده را فراهم آورد(۲۳). مطابق با مطالب اشاره شده، نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز حاکی از این است که توقف چرخه سلولی در مرحله G_1 و افزایش مقدار DNA در $Sub\text{-}G_1$ با افزایش رونویسی از ژن پروتئین‌های پروآپوپتوتیک هم چون p73 ، p21 ، Bax و Bad همراه می‌باشد. مشابه با نتایج به دست آمده در این مطالعه، پارک نشان داد که استفاده از داروی BIBR1532 در سلول‌های مقاوم به سیس‌پلاتین سبب مهار hTERT و در نتیجه افزایش بیان Bax ، آزاد شدن سیتوکروم C و در نهایت آپوپتوز می‌شود(۲۴).

نتیجه‌گیری

با انجام این مطالعه مشخص شد داروی BIBR1532 سبب مهار فعالیت متابولیک و ساخت DNA به طور وابسته به دوز و زمان در سلول‌های Nalm-6 می‌شود. هم چنین این دارو باعث افزایش بیان ژن‌های *p21* و *p73* و متعاقب آن افزایش جمعیت سلولی در مرحله G_1 و کاهش درصد سلولی در مرحله G_2/M می‌شود. به علاوه جمعیت سلولی در پیک $Sub\text{-}G_1$ که نشان‌دهنده آپوپتوز است، نیز افزایش یافت که این یافته با افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک Bax و Bad تأیید شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، می‌توان به افزوده شدن داروهای مبتنی بر استراتژی آنتی‌تلومرازی به رژیم درمانی بیماران لوسمیک به عنوان راهکار درمانی امیدبخش امیدوار بود.

References :

1- Braoudaki M, Lambrou GI, Vougas K, Karamolegou K, Tsangaris GT, Tzortzatou-Stathopoulou F. Protein biomarkers distinguish between high-and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner. J Hematol Oncol 2013; 6: 52.
2- Stankovic T, Marston E. Molecular mechanisms involved in chemoresistance in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. Srp Arh Celok Lek 2008; 136(3-4): 187-92.
3- Goto H. Childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: Biology and recent treatment progress. Pediatr Int 2015; 57(6): 1059-66.
4- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100(1): 57-70.
5- Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. Clin Cancer Res 2007; 13(17): 4960-3.
6- Mason M, Schuller A, Skordalakes E. Telomerase structure function. Curr Opin Struct Biol 2011; 21(1): 92-100.
7- Barma DK, Elayadi A, Falck JR, Corey DR. Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. Bioorg Med Chem Lett 2003; 13(7): 1333-6.
8- Bashash D, Ghaffari SH, Mirzaee R, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase inhibition by non-nucleosidic compound BIBR1532 causes rapid cell death in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. Leuk Lymphoma 2013; 54(3): 561-8.
9- Sumi M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Gotoh A, Shin-Ya K, *et al*. A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia. Int J Oncol 2004; 24(6): 1481-8.
10- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N, Kauffmann I, Priepke H, *et al*. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. EMBO J 2001; 20(24): 6958-68.
11- Shay JW, Keith WN. Targeting telomerase for cancer therapeutics. Br J Cancer 2008; 98(4): 677-83.
12- El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, Pantic M, Waller CF, Martens UM. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. Blood 2005; 105(4): 1742-9.
13- Shi Y, Sun L, Chen G, Zheng D, Li L, Wei W. A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines. Target Oncol 2015; 10(4): 565-73.
14- Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, *et al*. p73 Induces apoptosis via

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. J Biol Chem 2004; 279(9): 8076-83.
15- John K, Alla V, Meier C, Pützer BM. GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at mitochondria. Cell Death Differ 2011; 18(5): 874-86.
16- Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Stiewe T. Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. Oncogene 2006; 25(6): 813-26.
17- Wardi L, Alaaeddine N, Raad I, Sarkis R, Serhal R, Khalil C, *et al*. Glucose restriction decreases telomerase activity and enhances its inhibitor response on breast cancer cells: possible extra-telomerase role of BIBR 1532. Cancer Cell Int 2014; 14: 60.
18- Liu W, Yin Y, Wang J, Shi B, Zhang L, Qian D, *et al*. Kras mutations increase telomerase activity and targeting telomerase is a promising therapeutic strategy for Kras-mutant NSCLC. Oncotarget 2016 Jun 18. [Epub ahead of print]
19- Pantic M, Zimmermann S, Waller CF, Martens UM. The level of telomere dysfunction determines the efficacy of telomerase-based therapeutics in a lung cancer cell line. Int J Oncol 2005; 26(5): 1227-32.
20- Parsch D, Brassat U, Brümmendorf TH, Fellenberg J. Consequences of telomerase inhibition by BIBR1532 on proliferation and chemosensitivity of chondrosarcoma cell lines. Cancer Invest 2008; 26(6): 590-6.
21- Bashash D, Ghaffari SH, Kazerani M, Hezaveh K, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Time-Dependent Inhibitory Effect of Non-Nucleosidic Telomerase Inhibitor on NB4 Cell Proliferation through Transcriptional Suppression of Catalytic Subunit. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 10(4): 335-46 . [Article in Farsi]
22- Kong W, Lv N, Wysham WZ, Roque DR, Zhang T, Jiao S, *et al*. Knockdown of hTERT and Treatment with BIBR1532 Inhibit Cell Proliferation and Invasion in Endometrial Cancer Cells. J Cancer 2015; 6(12): 1337-45.
23- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993; 75(4): 805-16.
24- Park YP, Kim KD, Kang SH, Yoon DY, Park JW, Kim JW, *et al*. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT): a target molecule for the treatment of cisplatin-resistant tumors. Korean J Lab Med 2008; 28(6): 430-7.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 13(4): 314-323

Original Article

Induction of G_1 Cell Cycle Arrest and Increased Sub-G_1 Population upon Treatment of Nalm-6 Cells with Synthetic Inhibitor of hTERT

Zareii M.[1], Bashash D.[1]

[1]*Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

As the role of telomerase in unlimited proliferation is a common feature of the majority of human cancers including hematological malignancies, thus inhibition of this enzyme has been proposed as a novel strategy in cancer therapeutics. This study was performed to investigate the effect of BIBR1532, a synthetic inhibitor of hTERT, on metabolic activity, DNA synthesis rate, cell cycle activity, and expression of pro-apoptotic genes such as p21, p73, Bax, and Bad in Nalm-6 pre-B ALL cells.

Materials and Methods

In an experimental study, to investigate the effect of BIBR1532, Nalm-6 leukemic cells were cultured in the presence of various concentrations of the inhibitor and consequently MTT assay, BrdU cell proliferation assay, flowcytometeric cell cycle analysis, and quantitative real-time PCR were applied.

Results

Our results revealed that BIBR1532 induces an inhibitory effect on metabolic activity and DNA synthesis rate of Nalm-6 cells in a dose- and time-dependent manner. Moreover, we found that BIBR1532 exerts an inductive effect on mRNA expression level of Bax, Bad, p73, and p21, which in turn leads to G_1 cell cycle arrest and increased sub-G_1 cell population.

Conclusions

Since treatment with BIBR1532 could arrest the cell cycle activity in Nalm-6 cells and activate cellular apoptotic pathway, anti-telomerase-based therapy may be regarded as a novel promising strategy for ALL treatment.

Key words: Acute Lymphoid Leukemia, BIBR1532, Telomerase

Received: 3 Feb 2016
Accepted: 7 Sep 2016

Correspondence: Bashash D., PhD of Hematology & Blood Banking. Assiatant Professor of Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
Postal Code: 1971653312, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22721150
E-mail: *david_5980@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-02]