خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۳ پاییز ۹۶ (۲۲۶-۲۱۷)

مقاله پژوهشی

اثرات مهار بیان ژن *Msi2* بر الگوی بیانی مسیر Musashi2-Numb و ژن‌های درگیر در تکثیر و آپوپتوز سلول‌های لوکمی میلوئیدی مزمن

فروزان مرادی[۱]، صادق باباشاه[۲]، مجید صادقی‌زاده[۳]

چکیده

سابقه و هدف

بیان ژن ***Numb*** به عنوان ژن تعیین‌کننده سرنوشت سلول، سبب کاهش رشد سلول‌های لوکمیایی و سطوح بالای ژن ***Msi2*** منجر به مهار بیان ژن ***Numb*** در سلول‌های لوکمی میلوئیدی مزمن می‌گردد. هدف از مطالعه، مهار ژن ***Msi2*** توسط استراتژی **RNAi** و اثرات مهار ***Msi2*** بر بیان محور ***Musashi2-Numb*** و ژن‌های درگیر در تکثیر و آپوپتوز سلول‌های لوکمیایی **K562** بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، الیگونوکلئوتید **siRNA** سنتتیک که ژن ***Msi2*** را هدف قرار می‌دهد، با استفاده از لیپوفکتامین به سلول‌های **K562** به صورت دو بار تکرار ترانسفکت شد. تغییر بیان ژن‌های ***Msi2*** ، ***Numb*** ، ***P21*** و ***Bcl-2*** ، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، توسط **Real-time PCR** ارزیابی شد. از آزمون فلوسایتومتری **Annexin V-PI** جهت ارزیابی القای آپوپتوز استفاده شد. آنالیز آماری با آزمون **t-test** انجام گرفت.

یافته‌ها

با مهار ژن ***Msi2*** ، بیان ژن ***Numb*** در رده سلولی **K562** پس از ۴۸ ساعت به بیش از دو برابر افزایش و متعاقب با آن، بیان ژن ***P21*** به عنوان تنظیم کننده کلیدی چرخه سلولی افزایش و بیان ژن ***Bcl-2*** به عنوان ژن ضدآپوپتوز کاهش یافت($p< ۰/۰۵$). نتایج آزمون فلوسایتومتری، حاکی از افزایش القای آپوپتوز در سلول‌های **K562** ، به بیش از ۵۲٪ و ۶۰٪ به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن بود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد ژن ***Msi2*** گزینه‌ای اختصاصی برای هدف‌گیری سلول‌های لوکمیایی بوده و مهار آن از طریق استراتژی **RNAi** منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های لوکمیایی می‌گردد؛ که ممکن است گامی موثر به سوی درمان نهایی لوکمی به شمار آید.

کلمات کلیدی: لوکمی میلوئیدی مزمن، تزاید سلولی، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۹۶/ ۲/۳۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی ـ دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی ـ استادیارگروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ کد پستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶
۳- استاد گروه ژنتیک ـ دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

مقدمه

کروموزوم فیلادلفیا که در اثر جابه‌جایی دو طرفه بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ ایجاد می‌شود، شاخص سیتوژنتیک لوکمی میلوئیدی مزمن(CML ، Chronic myeloid leukemia) است. ماحصل این جابه‌جایی، شکل‌گیری ژن امتزاجی *BCR-ABL1* است که تایروزین کیناز همیشه فعال BCR-ABL1 را کد می‌نماید. کشف این مهم که پروتئین ادغامی BCR-ABL1 نقشی محوری در بیماری‌زایی CML ایفا می‌نماید، موجب تکامل و تحول در استراتژی‌های درمانی با هدف مهار اختصاصی این کیناز گردیده است (۳-۱). بد تنظیمی ژن‌های کلیدی که خودنوزایی و سرنوشت سلول را در سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic stem cells, HSCs) کنترل می‌کنند، می‌تواند در پیشرفت لوکمی نقش داشته باشد(۴). یکی از این بد تنظیمی‌ها مربوط به محور پیام‌رسانی *Musashi2-Numb* است. مطالعه‌های قبلی نشان داده است که در CML، ژن *Msi2* از ژن امتزاجی *Msi2/HoxA9* در پی شکست ناحیه ژنی *7p15* بازآرایی شده است(۵). گزارش‌ها حاکی از آن هستند که بین بیان ژن *Msi2* و بیان mRNA BCR-ABL1 ارتباطی وجود دارد(۸-۶). بیان *Msi2* در مرحله بحران بلاست CML در مقایسه با مرحله مزمن افزایش می‌یابد و این افزایش بیان در مرحله بلاستیک با خطر عود CML ارتباط مستقیمی دارد. ژن *Msi2* نه فقط در طول پیشرفت CML انسانی افزایش بیان می‌یابد بلکه یک نشانگر ضعیف بیماری نیز محسوب می‌شود. این نکته حائز اهمیت است که با پیشرفت CML از مرحله مزمن به مرحله بلاست، تکثیر افزایش می‌یابد در حالی که از درجه تمایز کاسته می‌شود(۹، ۸).

اگر چه مهارکننده‌های تیروزین کیناز، فعالیت کینازی پروتئین ادغامی BCR-ABL1 را مهار نموده و قادر به القای بهبودی نسبی در اکثریت مبتلایان به CML می‌باشند، گزارش‌هایی از عدم پاسخ بیماران به این نوع داروها وجود دارد که می‌توانند سبب عود بیماری به شیوه شدیدتر پس از درمان باشند(۱۰). فعالیت نابه‌جای مسیر پیام‌رسانی *Musashi2-Numb* در لوکمی و هم چنین سلول‌های بنیادی لوکمیایی گزارش شده است(۶). در مطالعه حاضر، ژن *Msi2* در محور تنظیمی *Musashi2-Numb* که به طور ویژه در سیستم‌های خونساز و سلول‌های لوکمیایی بیش تنظیم است، مورد ارزیابی قرار گرفت و احتمال مشارکت فعالیت ژن *Msi2* در بقای سلول‌های لوکمیایی بررسی شد. در این راستا به نظر می‌رسد ژن *Msi2* گزینه‌ای اختصاصی برای هدف‌گیری سلول‌های لوکمیایی بوده و مهار آن از طریق استراتژی RNAi منجر به افزایش در الگوی بیانی ژن *Numb* (به عنوان ژن تعیین کننده سرنوشت سلول)، افزایش الگوی بیانی ژن *P21* (ژن چرخه سلولی) و کاهش بیان ژن *Bcl-2* (ژن آنتی آپوپتوز) و القای آپوپتوز در این سلول‌ها گردد. استراتژی ارائه شده می‌تواند گامی مؤثر به سوی درمان نهایی انواع لوکمی‌های میلوئیدی باشد.

مواد و روش‌ها

کشت رده سلولی:

در یک مطالعه تجربی، رده سلولی K562 از سازمان انتقال خون تهیه شد. سلول‌های K562 در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گوساله (FBS ، Fetal Bovine Serum)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین(Penicillin G)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین(Streptomycin) و در انکوباتور مرطوب با ۵٪ دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

سرکوب بیان ژن Msi2 از طریق استراتژی تداخل RNA:

الیگونوکلئوتیدهای siRNA دو رشته‌ای سنتتیک که نواحی متفاوتی از رونوشت ژن *Msi2* را هدف می‌گیرند با شماره کاتولوگ(sc-75834) از شرکت سانتا کروز بیوتکنولوژی خریداری شد. برای انجام ترانسفکشن، تعداد مناسبی از سلول‌ها (حدود ۸۰ هزار سلول) به ازای هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. پس از آن که سلول‌ها به تراکم سطحی ۵۰٪ رسیدند، محیط کشت سلول‌ها تخلیه و سلول‌ها با PBS شستشو شدند. میزان ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون siRNA با غلظت ۲۰ Pmol/µL در ۲۴۵ میکرولیتر از محیط Opti-MEM (اینویتروژن) به

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

ازای هر چاهک افزوده شد. میزان ۶ میکرولیتر از واکنش‌گر لیپوفکتامین RNAiMAX در ۲۴۵ میکرولیتر از محیط Opti-MEM به ازای هر چاهک افزوده شد. دو محلول فوق با یکدیگر در آمیخته و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ الی ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. میزان ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک به هر یک از چاهک‌های حاوی سلول‌های آماده برای ترانسفکشن افزوده شد. میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مرحله قبل به هر یک از چاهک‌های پلیت افزوده شد و سپس پلیت جهت همگن شدن مخلوط تکان داده شد. یک تا دو روز بعد، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه تعویض شد و از سلول‌ها برای مطالعه‌های بعدی استفاده گردید.

استخراج RNA تام سلولی و ساخت cDNA:

جهت بررسی بیان ژن های مورد مطالعه، RNA تام از سلول با استفاده از واکنش‌گر ترایزول(اینویتروژن) استخراج و به منظور حذف آلودگی احتمالی با DNA ژنومی، با آنزیم DNase (فرمنتاز) تیمار شد. کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز تایید و خلوص و غلظت آن توسط اسپکتروفتومتری با جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. به منظور ساخت cDNA بر اساس روش کار ارائه شده توسط شرکت Takara، ابتدا مخلوط واکنشی شامل ۳ میکروگرم RNA تام استخراج شده، ۱ میکرولیتر آغازگر هگزامر تصادفی و ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP که توسط آب دیونیزه عاری از RNase به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانیده شد، تهیه گردید. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و بی‌درنگ روی یخ انتقال داده شد. سپس مخلوط واکنشی دوم شامل ۴ میکرولیتر بافر 5x PrimerScript™، ۰/۵ میکرولیتر مهار کننده RNAse، ۱ میکرولیتر آنزیم رونوشت‌بردار معکوس PrimeScript™ RTase که توسط آب دیونیزه عاری از RNase به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد، تهیه گردید. مخلوط واکنشی دوم به آرامی به مخلوط واکنشی اول افزوده و مخلوط واکنشی نهایی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه‌های cDNA ساخته شده تا زمان انجام PCR در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش Real-time PCR کمی و بررسی منحنی ذوب:

آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی برای ژن‌های *Msi2*، *Numb*، *P21*، *Bcl-2* و *GAPDH* توسط نرم‌افزار GeneRunner طراحی شدند(جدول ۱). ویژگی (Specificity) و یکتا بودن توالی آغازگرها در ژنوم انسان با استفاده از نرم‌افزار بلاست(http: //blast. ncbi. nlm. nih. gov/ Blast. cgi) ارزیابی شد. مخلوط واکنشی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green I Master Mix (تاکارا)، ۰/۵ میکرولیتر(معادل ۵ پیکومول) از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر (معادل ۵ نانوگرم) cDNA ساخته شده و ۸ میکرولیتر آب تهیه شد. واکنش Q-RT-PCR برای هر ژن، دو سری و به صورت هم زمان انجام شد و میانگین Ct (چرخه آستانه) به دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. واکنش در دستگاه ABI StepOne sequence Detection System (بیوسیستم) تحت شرایط دمایی و زمانی زیر انجام یافت: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله واسرشتگی اولیه در نظر گرفته شد. سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و مراحل اتصال/ توسعه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. از آن جایی که رنگ SYBR Green I که برای شناسایی محصول PCR استفاده می‌شود، به هر نوع DNA دو رشته‌ای متصل شده و توانایی تشخیص محصول اختصاصی از غیر اختصاصی را ندارد، لذا وجود مواردی چون جفت‌شدگی آغازگرها(دایمر پرایمر) یا محصول غیر اختصاصی نیز سبب افزایش در سیگنال نور فلورسنت می‌شوند(۱۱).

به منظور تأیید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی از نمودار ذوب (Melting curve) استفاده شد. از این رو، هر مرحله تکثیری کامل، توسط یک مرحله تفکیک(Dissociation) شامل

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

جدول ۱: آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی به کار رفته در سنجش Real-time PCR

ژن	دمای Tm	درصد GC	آغازگر	ترادف	طول قطعه(bp)
Gapdh	۶۱/۹۴	۵۷/۱۴	جلوبرنده	5′- ACACCCACTCCTCCACCTTTG -3'	۱۱۲
	۶۱/۹۹	۵۷/۱۴	معکوس	5′- TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	
Msi2	۵۹/۳۲	۵۰/۰۰	جلوبرنده	5′- AGCTCAGCCGAAAGAAGTCA-3'	۱۸۰
	۵۹/۴۵	۵۵/۰۰	معکوس	5′- AAGCCTGGGAACTGATAGCC-3'	
Numb	۵۹/۸۹	۵۵/۰۰	جلوبرنده	5′- GCTGTCAAGGACACAGGTGA-3'	۲۲۳
	۶۰/۰۹	۴۵/۴۵	معکوس	5′- CAGCTTTCTTGGCATCTTGCAT-3'	
P21	۶۲/۲۶	۵۰/۰۰	جلوبرنده	5′- ACCTGTCACTGTCTTGTACCCTTG-3'	۱۳۱
	۵۹/۸۷	۴۷/۸۳	معکوس	5′- GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTG-3'	
Bcl-2	۶۰/۱۸	۵۵/۰۰	جلوبرنده	5′- CCCGCGACTCCTGATTCATT-3'	۱۶۷
	۶۰/۲۸	۴۴/۰۰	معکوس	5′- CAGTCTACTTCCTCTGTGATGTTGT-3'	

۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه به منظور تجزیه و تحلیل منحنی ذوب ادامه یافت.

با اتمام تکثیر و بر اساس نمودار رسم شده، چرخه آستانه (Cycle of threshold, CT) تعیین شد. در ادامه پس از محاسبه تفاضل میانگین CT ژن مرجع از میانگین CT ژن مورد نظر برای هر دو نمونه کنترل و آزمایش، شاخص ΔCT در دو نمونه کنترل و آزمایش به دست آمد. هم چنین از تفاضل دو ΔCT ، شاخصی تحت عنوان ΔΔCT محاسبه شد. در ادامه نسبت تغییرات بیانی بین دو نمونه آزمایش و کنترل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد. مقادیر رونوشت‌های ژن‌های هدف در مقایسه با بیان ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه‌دار(Housekeeping) تعیین شد.

بررسی فلوسایتومتری سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با Annexin V-FITC و PI :

میزان القای آپوپتوز توسط رنگ آمیزی با کیت شناسایی آپوپتوز Annexin-V FITC (سیگما) مطابق دستورالعمل سازنده سنجیده شد. در این زمینه، سلول‌ها ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن با PBS شستشو و در بافر اتصال به صورت سوسپانسیون درآورده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ Annexin V-FITC به ازای هر ۱۰۶ سلول افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی انکوبه شد.

پس از شستشوی مجدد، رسوب سلولی در بافر اتصال محلول و میزان ۵ میکرولیتر از محلول PI به واکنش افزوده و سلول‌ها با کمک دستگاه فلوسیتومتر(Becton Dickinson) آنالیز شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار Flowing Software 2 انجام شد. سلول‌های زنده به صورت (Annexin V منفی/ PI منفی)، سلول‌های در مرحله آپوپتوز اولیه به صورت(Annexin V مثبت/ PI منفی)، سلول‌های در مرحله آپوپتوز نهایی به صورت (Annexin V مثبت/ PI مثبت) و سلول‌های نکروز یافته به صورت (Annexin V منفی/ PI مثبت) نمایش داده شدند.

آنالیز آماری داده‌ها:

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. آنالیز آماری تغییرات داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 6 و با استفاده از آزمون t-test انجام شد. مقادیر p-value کوچکتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

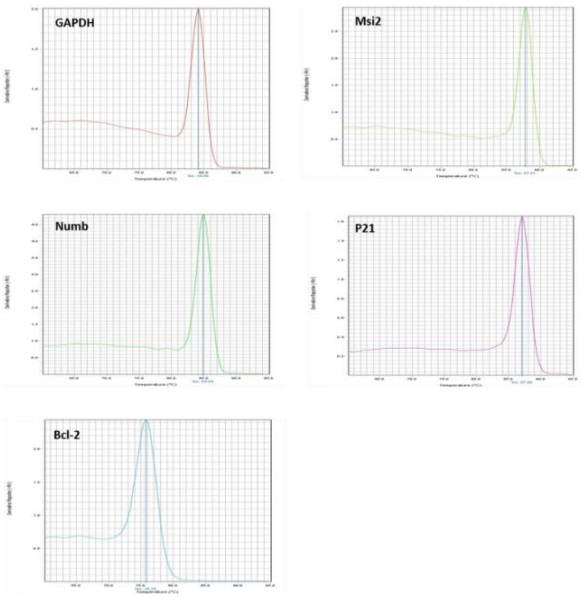
یافته‌ها

بررسی اختصاصی بودن تکثیر توسط آنالیز منحنی ذوب:

در شکل ۱ با توجه به وجود تنها یک پیک مشاهده شده

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

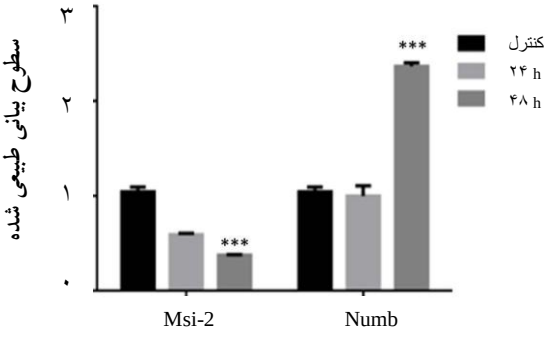
برای هر ژن در دمای ذوب منحصر به خودش، اختصاصی بودن محصول Real-time PCR مشخص گردید. بر این اساس از عدم وجود مواردی چون تکثیر غیر اختصاصی، جفت‌شدگی آغازگرها(دایمر پرایمر) و آلودگی اطمینان حاصل شد.



شکل ۱: منحنی‌های ذوب ژن‌های مورد مطالعه؛ وجود تنها یک پیک برای هر ژن در دمای ذوب ویژه آن، نشان‌دهنده اختصاصی بودن محصول تکثیر بود.

ارزیابی بیان رونوشت ژن‌های Msi2 و Numb در سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siRNA اختصاصی بر علیه Msi2:

به منظور بررسی اثرات خاموش‌کنندگی siRNA بر روی بیان رونوشت ژن *Msi2* ، رده سلولی k562 که با siRNA اختصاصی علیه Msi2 (siMsi2) یا الیگونوکلئوتیدهای کنترل خاموش‌سازی(siCtrl) ترانسفکت شده بودند، پردازش و برای ارزیابی میزان بیان mRNA آنالیز شدند. نتایج آنالیز Real-time PCR نشان داد siMsi2 باعث کاهش محسوس در بیان mRNA ژن *Msi2* در سلول‌های ترانسفکت شده به شیوه وابسته به زمان می‌شود(p< ۰/۰۵) (نمودار ۱). به منظور بررسی ارتباط ممکن مابین دو ژن *Msi2* و *Numb* (به عنوان ژن تعیین سرنوشت سلول)، سطوح رونوشت‌های Numb در پی خاموش‌سازی بیان *Msi2* بررسی شد. نتایج Real-time PCR نشان داد سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siMsi2 دارای سطوح به مراتب بیشتری از رونوشت‌های *Numb* در مقایسه با گروه سلولی کنترل بودند(p< ۰/۰۵)(نمودار ۱).

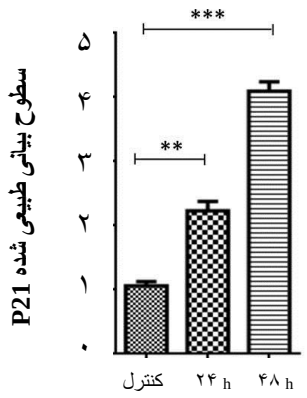


نمودار ۱: سطوح نسبی بیان رونوشت‌های *Msi2* و *Numb* در رده سلول لوکمیایی K562 ترانسفکت شده با siMsi2 . همان گونه که ملاحظه می‌شود عملکرد *siMsi2* منجر به کاهش محسوس بیان رونوشت *Msi2* در رده سلولی K562 به شیوه وابسته به زمان شده است. هم چنین عملکرد *siMsi2* باعث افزایش محسوس در سطوح نسبی بیان رونوشت *Numb* پس از ۴۸ ساعت شده است. تغییرات بیان هر دو ژن از نظر آماری معنادار می‌باشد(p< ۰/۰۵).

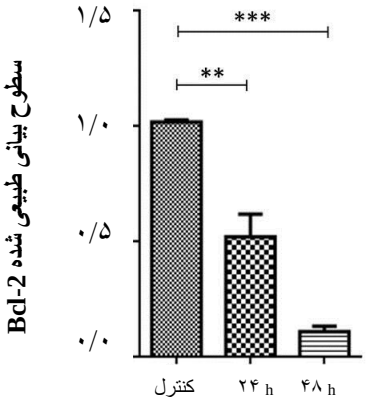
ارزیابی بیان رونوشت ژن‌های p21 و Bcl-2 در سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siRNA اختصاصی برعلیه Msi2:

به منظور بررسی اثر عملکردی سرکوب بیان ژن *Msi2* ، میزان سطوح بیانی رونوشت ژن‌های *p21* و *Bcl-2* در سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siMsi2 در مقایسه با گروه کنترل ارزیابی شد. نتایج Real-time PCR نشان داد بیان ژن *P21* در رده سلولی K562 ترانسفکت شده با siMsi2 نسبت به سلول‌های گروه کنترل به شیوه وابسته به زمان افزایش یافت(p< ۰/۰۵)(نمودار ۲). ارزیابی بیان ژن ضد آپوپتوز *Bcl-2* نیز نشان داد بیان این ژن در رده سلول‌های ترانسفکت شده با siMsi2 نسبت به سلول‌های گروه کنترل به شیوه وابسته به زمان کاهش یافت(p< ۰/۰۵) (نمودار ۳).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]



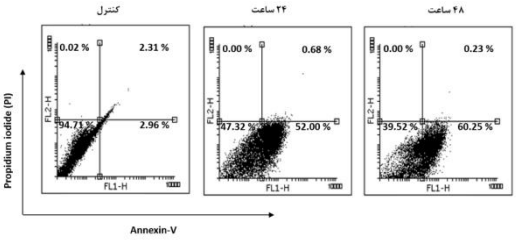
نمودار ۲: سطوح نسبی بیان رونوشت ژن *p21* در رده سلول لوکمیایی K562 ترانسفکت شده با siMsi2 . همان گونه که ملاحظه می‌شود عملکرد siMsi2 منجر به افزایش محسوس بیان رونوشت p21 در رده سلولی K562 به شیوه وابسته به زمان شده است تغییرات بیان ژن از نظر آماری معنادار می‌باشد(۰/۰۵ >p).



نمودار ۳: سطوح نسبی بیان رونوشت ژن *Bcl-2* در رده سلول لوکمیایی K562 ترانسفکت شده با siMsi2 . همان گونه که ملاحظه می‌شود عملکردsiMsi2 منجر به کاهش محسوس بیان رونوشت Bcl-2 در رده سلولی K562 به شیوه وابسته به زمان شده است. تغییرات بیان ژن از نظر آماری معنادار می‌باشد(۰/۰۵ >p).

ارزیابی القای آپوپتوز در سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siRNA اختصاصی برعلیه Msi2 :

به منظور بررسی احتمال وقوع آپوپتوز در پی سرکوب بیان ژن *Msi2* ، سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siMsi2 با Annexin V رنگ‌آمیزی و میزان مرگ سلولی توسط بررسی فلوسایتومتری سنجیده شد. آنالیز هیستوگرام‌های Annexin V/ PI فلوسایتومتری نشان داد سرکوب بیان ژن *Msi2* در سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siMsi2 ، آپوپتوز را به طور محسوسی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. آنالیز هیستوگرام‌های Annexin سنجش منتخب برای رده سلولی K562 ، نشان داد که ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن با siMsi2 ، بالغ بر ۵۲٪ سلول‌ها دچار آپوپتوز شده است(شکل ۲). هم چنین میزان آپوپتوز پس از ۴۸ ساعت به بیش از ۶۰٪ افزایش یافت.



شکل ۲: بررسی +Annexin V+/PI سلول‌های K562 ترانسفکت شده شده با siMsi2 در یک سنجش منتخب. سلول‌های مرده به صورت نکروتیک(Annexin V منفی/ PI مثبت) یا آپوپتوتیک (Annexin V مثبت/ PI منفی و Annexin V مثبت/ PI مثبت) در نظر گرفته می‌شوند. محور x ، Annexin-V-FITC و محور y ، Propidium iodide (PI) را نشان می‌دهد. همان گونه که ملاحظه می‌شود سرکوب بیان ژن *Msi2* در سلول‌های لوکمیایی ترانسفکت شده با siMsi2 آپوپتوز را به طور محسوسی در مقایسه با گروه سلولی کنترل افزایش داده است.

بحث

بر اساس نتایج این تحقیق، به نظر می رسد ژن *Mis2* گزینه‌ای اختصاصی برای هدف‌گیری سلول‌های لوکمیایی بوده و مهار آن از طریق استراتژی RNAi ، منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های لوکمیایی می‌گردد. لوکمی میلوئیدی مزمن(CML)، نوعی بدخیمی تکثیر شونده دودمان میلوئیدی است که از سلول بنیادی خونساز ایجاد می‌گردد و دارای مراحل مزمن و بحران بلاست می‌باشد. عامل بروز این اختلال، فعالیت تیروزین کینازی مداوم حاصل از بیان انکوژن BCR-ABL1 است، بر همین اساس امروزه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

درمان‌های نسبتاً مناسب بالینی بر پایه استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کیناز بنا شده است ولی این روند درمانی همیشه موفقیت‌آمیز نبوده و برخی از بیماران نسبت به این نوع از داروها از خود مقاومت نشان می‌دهند. در نتیجه درمان با این داروها دارای محدودیت‌هایی می‌باشد لذا روش‌های درمان مولکولی جدید مد نظر قرارگرفته است(۱۴-۱۲).

مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند که مسیر Musashi2-Numb ، نقشی اساسی در لوکموژنز بر عهده دارد و فعالیت آن منجر به تکثیر، توسعه و بقای سلول‌های لوکمیایی می‌شود(۱۷-۱۵). *Msi2* مارکر پیش آگهی ضعیفی گزارش شده است که در تعیین استراتژی درمانی لوکمی ارزش تشخیصی زیادی دارد(۱۹، ۱۸). در این راستا، خاراس و همکاران نشان دادند بیان *Msi2* در شکل‌گیری کلونی‌های خونساز با فنوتیپ میلوئیدی نابالغ در شرایط آزمایشگاهی افزایش می‌یابد و در داخل بدن سبب گسترش سلول‌های بنیادی خونساز(HSCs) و سلول‌های پیش‌ساز کوتاه‌مدت می‌گردد(۲۰). از طرفی گزارش نمودند *Msi2* در مراحل پیشرفته CML (مرحله بحران بلاست) در سطوح بالاتری نسبت به مراحل اولیه CML (مرحله مزمن) بیان می‌شود و این افزایش سطوح بیانی *Msi2* در ارتباط معکوس با میزان بیان ژن *Numb* می‌باشد. در سال ۲۰۱۰، ایتو و همکاران ارتباط مابین افزایش بیان *Numb* و کاهش سلول‌های لوکمی در مدل‌های موشی را گزارش نمودند(۸). آن‌ها نشان دادند که سطوح بیانی *Numb* می‌تواند مانع پیشرفت بیماری شود. علاوه بر آن، گزارش کردند مهار بیان ژن *Msi2* با استفاده از shRNA رشد سلول‌های لوکمی و نرخ بقا را به طور قابل توجهی به خصوص در مرحله بحران بلاست کاهش می‌دهد. مشابه با القای *Numb* ، مهار *Msi2* توسط shRNA تمایز را در سلول‌های لوکمی القا می‌کند و توانایی تکثیر و انتشار آن‌ها را مهار می‌کند. در سال ۲۰۱۶ گارسیا ـ آلگریا و همکاران غیرفعال‌سازی سطوح بیانی *Numb* برای کاهش سلول‌های لوکمیایی را تایید کردند(۱۲). در سال ۲۰۱۰ خاراس و همکاران به دنبال مهار ژن *Msi2* ، افزایش بیان رونوشت *Numb* را در رده سلولی LAMA-84 (رده سلولی مشتق شده از بیماران مرحله بحران بلاستیک CML) گزارش نمودند(۲۰).

در مطالعه حاضر، بیان ژن *Numb* در رده سلولی K562 (رده سلول میلوئیدی مربوط به CML)، پس از ترانسفکت siRNA علیه ژن *Msi2* بررسی گردید و ارتباط معکوس بین ژن *Msi2* و *Numb* در رده سلولی مذکور نیز مشهود بود. در این مطالعه دریافتیم مهار ژن *Msi2* منجر به افزایش بیان ژن *P21* به عنوان ژن کلیدی چرخه سلولی در سلول‌های K562 می‌گردد. مطابق با نتایج ما، ژانگ و همکاران نشان دادند که مهار *Msi2* منجر به کاهش تکثیر در رده سلولی KG-1a (رده سلول میلوئیدی مربوط به لوکمی میلوئیدی حاد یا AML) می‌گردد(۲۱). خاراس و همکاران کاهش تکثیر را به دنبال مهار *Msi2* ، در رده‌های سلولی Nomo-1 و THP-1 (مشتق از لوکمی میلوئیدی حاد) و LAMA-84 و AR230 (مشتق از لوکمی میلوئیدی مزمن) گزارش نمودند. به طور مشابه اندروس‌ـ آگوآیو و همکاران و هوپ و همکاران نشان دادند که مهار*Msi2* به طور چشمگیری سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک موش را در فاز S-G2/M کاهش می‌دهد(۲۳-۲۱).

در این مطالعه هم‌چنین مشاهده کردیم که مهار *Msi2* درصد آپوپتوز اولیه و نهایی را در سلول‌های K562 افزایش می‌دهد، این یافته‌ها با نتایج خاراس و همکاران که گزارش نمودند مهار *Msi2* توسط shRNA سبب القای قابل توجه آپوپتوز در رده‌های سلولی لوکمی Nomo-1 و THP-1 و LAMA-84 و AR230 شده است، سازگار است(۲۰). علاوه بر آن، در این مطالعه مشخص شد رونوشت Bcl-2 که فاکتور مهم ضد آپوپتوزی است، بعد از مهار *Msi2* در رده سلولی K562، به طور چشمگیری کاهش یافت. نتایج ما با یافته‌های مطالعه ژانگ و همکاران که القای آپوپتوز را با کاهش بیان *Bcl-2* در سطح mRNA و پروتئین نشان دادند، سازگار است (۲۲).

نتیجه‌گیری

اگر چه در سال‌های اخیر گام‌های مهمی در جهت درمان مبتلایان لوکمی برداشته شده است، ارائه رویکردی که به طور اختصاصی قادر باشد سبب کاهش سلول‌های لوکمیایی شود، می‌تواند نویدبخش درمان مؤثر سرطان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

باشد(۲۶-۲۴). به نظر می‌رسد هدف‌گیری ژن‌های کلیدی می‌تواند استراتژی درمانی مؤثری را برای از بین بردن سلول‌های لوکمیایی مزمن ارائه دهد. در مطالعه حاضر احتمال مشارکت فعالیت مسیر پیام‌رسانی Musashi2- Numb در القای آپوپتوز سلول‌های لوکمیایی بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، مهار *Msi2* از طریق استراتژی تداخل RNA (RNA interference, RNAi) منجر به افزایش سطوح بیانی ژن *Numb* (به عنوان ژن تعیین کننده سرنوشت سلول)، القای آپوپتوز، افزایش الگوی بیانی ژن *P21* (ژن چرخه سلولی) و کاهش ژن *Bcl-2* (ژن آنتی آپوپتوزی) در سلول‌های K562 گردید. آنچه به عنوان مکانیسمی محتمل در این زمینه می‌تواند مطرح باشد این است که اثرات مهاری سرکوب بیان *Msi2* روی سلول‌های لوکمیایی ممکن است با اثرات تنظیمی *Numb* که عاملی تعیین‌کننده در سرنوشت سلول است، مرتبط باشد زیرا کاهش بیان *Msi2* سبب افزایش سطوح بیانی *Numb* که باعث از بین رفتن سلول‌های CML می‌شود، می‌گردد و این یافته‌ها احتمالاً در ارتباط با مسیرهای پیام‌رسانی دیگری است که در نهایت رشد سلول‌های لوکمی را کاهش می‌دهند. در این راستا، مطالعه‌های بیشتری نیاز است. استراتژی ارایه شده می‌تواند گامی مؤثر به سوی درمان نهایی لوکمی میلوئیدی به شمار آید.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مولکولی است و با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس و ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری(موافقت نامه ۱۱/۷۷۲۳۰) انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و هم چنین معاونت محترم علمی و فناوری ریاست جمهوری اعلام می‌دارند.

References:

1- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96(10): 3343-56.
2- Sawyers CL. Even better kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2010; 362(24): 2314-5.
3- Campiotti L ,Suter MB, Guasti L, Piazza R, Gambacorti-Passerini C, Grandi AM, *et al*. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. Eur J Cancer 2017; 77: 48-56.
4- Kharas MG, Lengner CJ. Stem Cells, Cancer, and MUSASHI in Blood and Guts. Trends Cancer 2017; 3(5): 347-56.
5- Barbouti A, Höglund M, Johansson B, Lassen C, Nilsson P-G, Hagemeijer A, *et al*. A novel gene, MSI2, encoding a putative RNA-binding protein is recurrently rearranged at disease progression of chronic myeloid leukemia and forms a fusion gene with HOXA9 as a result of the cryptic t (7; 17)(p15; q23). Cancer Res 2003; 63(6): 1202-6.
6- Kaeda J, Ringel F, Oberender C, Mills K, Quintarelli C, Pane F, *et al*. Up-regulated MSI2 is associated with more aggressive chronic myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2015; 56(7): 2105-13.
7- Kaeda J, Ringel F, Oberender C, Gresse M, Amini L, Schwarz M, *et al*. Longitudinal Study to Assess the Clinical Significance of MSI2 Expression in Chronic Myeloid Leukemia Patients. Acta Haematol 2016; 136(1): 62-4.
8- Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, Congdon KL, Blum J, Lento WE, *et al*. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. Nature 2010; 466(7307): 765-8.
9- Nishimoto Y, Okano H. New insight into cancer therapeutics: induction of differentiation by regulating the Musashi/Numb/Notch pathway. Cell Res 2010; 20(10): 1083-5.
10- Essers MA, Trumpp A. Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. Mol Oncol 2010; 4(5): 443-50.
11- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 2005; 39(1): 75-85.
12- García-Alegría E, Lafita-Navarro MC, Aguado R, García-Gutiérrez L, Sarnataro K, Ruiz-Herguido C, *et al*. NUMB inactivation confers resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia cells. Cancer Lett 2016; 375(1): 92-9.
13- Rousselot P, Huguet F, Rea D, Legros L, Cayuela JM, Maarek O, *et al*. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years.
Blood 2007; 109(1): 58-60.
14- Mauro MJ, Druker BJ, Maziarz RT. Divergent clinical

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. Leuk Res 2004; 28 Suppl 1: S71-3.
15- Griner LN, Reuther GW. Aggressive myeloid leukemia formation is directed by the Musashi 2/Numb pathway. Cancer Biol Ther 2010; 10(10): 979-82.
16- Park SM, Gonen M, Vu L, Minuesa G, Tivnan P, Barlowe TS, *et al*. Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia-driven stem cell regulatory program. J Clin Invest 2015; 125(3): 1286-98.
17- Kudinov AE, Karanicolas J, Golemis EA, Boumber Y. Musashi RNA-binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets. Clin Cancer Res 2017; 23(9): 2143-53.
18- Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Ishikawa Y, Fujimoto A, *et al*. Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. Histopathology 2005; 47(4): 348-56.
19- Byers RJ, Currie T, Tholouli E, Rodig SJ, Kutok JL. MSI2 protein expression predicts unfavorable outcome in acute myeloid leukemia. Blood 2011; 118(10): 2857-67.
20- Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, Bullinger L, Ball B, Zaidi S, *et al*. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. Nat Med 2010; 16(8): 903-8.
21- de Andrés-Aguayo L, Varas F, Kallin EM, Infante JF, Wurst W, Floss T, *et al*. Musashi 2 is a regulator of the HSC compartment identified by a retroviral insertion screen and knockout mice. Blood 2011; 118(3): 554-64.
22- Zhang H, Tan S, Wang J, Chen S, Quan J, Xian J, *et al*. Musashi2 modulates K562 leukemic cell proliferation and apoptosis involving the MAPK pathway. Exp Cell Res 2014; 320(1): 119-27.
23- Hope KJ, Cellot S, Ting SB, MacRae T, Mayotte N, Iscove NN, et al. An RNAi screen identifies Msi2 and Prox1 as having opposite roles in the regulation of hematopoietic stem cell activity. Cell Stem Cell 2010; 7(1): 101-13.
24- Chavez-Gonzalez A, Bakhshinejad B, Pakravan K, Guzman ML, Babashah S. Novel strategies for targeting leukemia stem cells: sounding the death knell for blood cancer. Cell Oncol (Dordr) 2017; 40(1): 1-20.
25- Babashah S. Cancer stem cells: emerging concepts and future perspectives in translational oncology. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. p. 140-5.
26- Babashah S, Rezaei-Tavirani M, Zamanian-Azodi M, Saki N. Chronic myeloid leukemia as a stem cell-derived malignancy. Journal of Paramedical Sciences 2012; 3(2): 43-55.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 14(3): 217-226

Original Article

The Effects of Msi2 Knock down on Expression Levels of Musashi2-Numb Pathway and Genes Involved in the Proliferation and Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Cells

Moradi F.[1], Babashah S.[1], Sadeghizadeh M.[1]

[1]*Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

The expression of Numb as a cell-fate determinant gene leads to inhibition of leukemic cell growth. The high levels of Musashi2 (Msi2) results in down-regulation of Numb in chronic myeloid leukemia cells. In this study we knocked down Msi2 using RNA interference (RNAi) strategy and investigated the effects of this knock down on the expression of Musashi2-Numb axis and genes involved in proliferation and apoptosis.

Materials and Methods

In this experimental study, synthetic double stranded siRNAs designed to target human Msi2 were transfected to K562 cells using Lipofectamine in duplicate. Changes in the expression levels of Msi-2, Numb, P21, and Bcl-2 genes 48h after transfection were evaluated by real-time PCR. Induction of apoptosis in transfected leukemic cells was determined using Annexin-PI staining and flowcytometry analysis. Data were analyzed by t-test.

Results

We found that upon Msi2 suppression, the expression levels of the cell-fate determinant Numb showed two-fold increase in K562 cells ($p < 0/05$). Msi2 down-regulation and subsequent increase in Numb expression levels caused the elevated expression of p21, as a cell cycle regulator ($p < 0/05$). In addition, Msi2 down-regulation promoted cell apoptosis via the down-regulation of Bcl-2 expression ($p < 0/05$). We observed that the rates of apoptosis in leukemic increased to 52% and 60%, 24h and 48h after transfection.

Conclusions

It seems that Msi2 could be an option for targeting leukemic cells and its down-regulation through RNAi strategy may lead to induction of apoptosis in leukemic cells. This approach may open up new opportunities for leukemia therapy.

Key words: Leukemia, Chronic Myeloid, Cell Proliferation, Apoptosis

Received: 5 Feb 2017
Accepted: 20 May 2017

Correspondence: Babashah S., PhD of Molecular Genetics. Assistant Professor of Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University.
Postal Code: 1411713116, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82884468; Fax: (+9821) 82884717
E-mail: *sadegh.babashah@gmail.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-10-31]