خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۵ شماره ۲ تابستان ۹۷ (۱۳۲-۱۲۰)

مقاله پژوهشی

اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6)

نرگس قاسمی‌مهر[۱]، زینت یزدانی[۱]، علیرضا فارسی نژاد[۲]، روح‌اله میرزایی خلیل آبادی[۲]، احمد فاطمی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

در حالی که تلومراز در ۹۰٪-۸۵٪ سرطان‌ها از جمله در لوسمی لنفوبلاستیک حاد بیان می‌شود، در سلول‌های طبیعی بیان ناچیزی داشته و مهار آن می‌تواند یک رویکرد درمانی هدفمند برای درمان سرطان باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز سلول‌های NALM-6 بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف MST-312 تیمار شدند. سپس در زمان‌های مختلف زنده مانی سلولی با آزمون تریپان‌بلو، فعالیت متابولیک سلولی با روش رنگ سنجی MTT ، آپوپتوز سلولی به روش فلوسیتومتری با استفاده از اتصال به آنکسین -7AAD/V و آپوپتوز در سطح ژن با بررسی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بیش از ۵۰٪ کاهش در زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸ میکرومولار MST-312 به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد. مقادیر میانگین و انحراف معیار درصد زنده‌مانی در زمان‌های صفر و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۰۰٪ و ۲/۵٪ ± ۹۳/۵٪ به دست آمد. فعالیت متابولیک سلولی پس از تیمار ۴۸ ساعته در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار به ترتیب ۶٪، ۱۹/۶۹٪ و ۵۶/۹٪ کاهش یافت. مواجهه ۴۸ ساعته سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312 ، منجر به افزایش ۲۰٪ در آپوپتوز سلولی، افزایش ۲/۱۱ برابری بیان ژن *Bax* و کاهش ۰/۶۱ برابری بیان ژن *Bcl-2* گردید.

نتیجه گیری

MST-312 با مهار تلومراز و القای آپوپتوز در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد NALM-6، می‌تواند به عنوان کاندیدی جدید برای درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیشنهاد شود.

کلمات کلیدی: **تلومراز، آپوپتوز، لوسمی لنفوبلاستیک حاد**

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۱۹
تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ـ کرمان ـ ایران
۲- PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ـ کرمان ـ ایران
۳- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان ـ میدان پژوهش ـ کرمان ـ ایران ـ کدپستی: ۹۹۱۶۹۶۴۴۰۷

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

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL) یک بدخیمی خونی ناشی از تکثیر و تجمع بیش از حد پیش‌سازهای لنفوسیتی در مغز استخوان و خون محیطی می‌باشد(۱). شایع‌ترین علائم بالینی شامل تب، کاهش وزن و خستگی است که گاها" همراه با بزرگی طحال، کبد و غدد لنفاوی و خونریزی‌های زیر جلدی به صورت پتشی و پورپورا می‌باشد(۳، ۲). هم چنین رشد بیش از حد پیش‌سازهای بدخیم لنفوییدی باعث اشغال مغز استخوان شده و علائم مرتبط با آن شامل: کم خونی، ترمبوسیتوپنی و نوتروپنی بروز می‌کند(۴). علی‌رغم این که عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی به عنوان فاکتورهای دخیل در وقوع این بیماری معرفی شده‌اند، اما هنوز اتیولوژی آن مبهم باقی مانده است (۵). لوسمی لنفوبلاستیک حاد در تمام سنین رخ می‌دهد. هر چند در بزرگسالان کمتر از ۱٪ از بدخیمی‌ها را شامل می‌شود، اما در کودکان(با یک پیک وقوع در سنین ۵-۲ سال) از شیوع بالاتری برخوردار بوده و به عنوان شایع‌ترین بدخیمی سنین کودکی مطرح می‌باشد، به طوری که ۲۵٪ کل بدخیمی‌ها و ۸۰٪ لوسمی‌های حاد کودکان را شامل می‌شود(۹-۶). هر چند درمان ALL با رژیم‌های شیمی درمانی موفقیت‌آمیز بوده است، اما با اثرات سیتوتوکسیک بر روی بافت‌ها و مرگ و میر مرتبط با درمان همراه است. هم چنین در ۲۰٪-۱۵٪ موارد ALL کودکان و ۵۰٪ موارد ALL بزرگسالان، عود رخ می‌دهد که در مقایسه با بیماری اولیه، موارد عود با مقاومت به درمان و بقای ضعیف همراه است. بنابراین لزوم کاربرد هدف‌های درمانی جدید به منظور کاهش این مشکلات ضروری به نظر می‌رسد(۱۰، ۹). یکی از ویژگی‌های شاخص و مشترک که در اکثر سرطان‌ها مشاهده می‌شود، توانایی تکثیر نامحدود سلول‌هاست، که به واسطه بیان بالای آنزیمی به نام تلومراز حاصل می‌شود. تلومراز از طریق بازسازی توالی تلومر از مرگ سلولی ناشی از رسیدن طول تلومر به حد بحرانی جلوگیری کرده و به سلول قدرت نامیرایی و تکثیر نامحدود می‌دهد(۱۱). از آن جایی که سلول طبیعی تقریباً فاقد فعالیت آنزیم تلومراز می‌باشد، در نتیجه استفاده از عوامل مهارکننده تلومراز نمی‌تواند روی این سلول‌ها اثر ویژه‌ای داشته باشد. این درحالی است که تلومراز در ۹۰٪-۸۵٪ سرطان‌های انسانی دوباره فعال می‌شود. با توجه به نیاز سلول‌های سرطانی به سطح بالای آنزیم تلومراز برای ادامه روند تکثیر، تلومراز می‌تواند یک هدف مناسب در درمان و مهار سرطان به حساب آید(۱۳، ۱۲). در لوسمی لنفوبلاستیک حاد، سطح فعالیت آنزیم تلومراز در نمونه مغز استخوان گرفته شده از بیماران به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه افراد طبیعی است و تلومراز به عنوان یک مارکر بدخیمی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد تلقی می‌شود(۱۵، ۱۴). از جمله مهارکننده‌های تلومراز می‌توان به ترکیبات مشتق از اپیگالوکاتچین گالات(EGCG)، مثل MST-312 اشاره کرد. EGCG (Epigallocatechin gallate) یک کاتچین اصلی چای سبز است که به صورت مؤثری تلومراز را مهار و رشد سلول را متوقف می‌کند(۱۶). MST-312 که مهارکننده تلومراز شماره ۹ نام دارد، فعالیتی وابسته به دوز داشته، به طوری که در دوزهای پایین(۰/۷۵ میکرومولار) فعالیت ضد تلومرازی دارد و در دوزهای بالا(۲ میکرومولار)، سلول را به سمت مرگ سلولی سوق می‌دهد(۱۷). در مطالعه‌های گذشته اثر MST-312 بر القای آپوپتوز به واسطه افزایش ژن‌های شروع‌کننده آپوپتوز مانند Bax و هم چنین کاهش بیان ژن‌های مهارکننده آپوپتوز مانند Bcl-2 نشان داده شده است(۱۸). هدف مطالعه حاضر بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر آپوپتوز رده سلولی NALM-6 می‌باشد. با توجه به مطالعه‌های گذشته، رده سلولی NALM-6 دارای فعالیت بالای آنزیم تلومراز می‌باشد(۲۰، ۱۹). چنانچه مهار تلومراز بتواند مرگ سلولی را در رده سلولی NALM-6 القا کند، می‌توان مهار تلومراز را به عنوان استراتژی درمانی سودمندی در درمان ALL معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در یک مطالعه تجربی، رده سلولی NALM-6 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی(FBS)

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

و ۱٪ پنی‌سیلین –استرپتومایسین(U/mL ۱۰۰ پنی‌سیلین و µg/mL ۱۰۰ استرپتومایسین) در انکوباتور با رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. محلول ذخیره MST-312 (سیگما آلدریچ، آمریکا) با جرم مولی ۳۸۰/۳۵ گرم بر مول تهیه شد. برای تهیه محلول ذخیره، ۵ میلی‌گرم دارو در ۱ میلی‌لیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد و غلظت ۱۳/۱۴ میلی‌مولار (۱۳۱۴۰میکرومولار) به دست آمد. محلول کار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار در حجم ۵۰۰ میکرولیتر تهیه و حجم مناسب برای به دست آمدن غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار تعیین شد.

سنجش زنده‌مانی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو:

برای بررسی درصد زنده‌مانی سلولی، سلول‌های NALM-6 با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو سنجش شدند. این آزمون در واقع روشی کمی برای تعیین درصد سلول‌های زنده و مرده است. تریپان‌بلو از غشای هر دو سلول زنده و مرده عبور می‌کند ولی تنها سلول‌های زنده به دلیل داشتن فعالیت حیاتی قادر به دفع رنگ تریپان‌بلو می‌باشند. به عبارت دیگر در این آزمون سلول‌های زنده به صورت سفید و شفاف و سلول‌های مرده به رنگ آبی تیره در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده‌اند. سلول‌ها در پلیت کشت سلولی ۱۲ خانه با تراکم ۲×۱۰^{۵} سلول در هر خانه کشت داده شده و با غلظت‌های ۰، ۲، ۴و ۸ میکرومولار داروی MST-312 تیمار شدند. پس از پایان انکوباسیون در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت، سوسپانسیون سلولی با محلول تریپان ۰/۴٪ (سیگما، آلدریچ، آمریکا)، به نسبت ۱ به ۱ مخلوط شدند. پس از ۱ الی ۲ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، مخلوط مورد نظر بر روی لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ بررسی شد. سلول‌های زنده(شفاف) و مرده(آبی) شمارش شدند و زنده‌مانی سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

= درصد زنده‌مانی
۱۰۰× (تعداد کل سلول‌ها/تعداد سلول‌های زنده)

سنجش فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 با روش رنگ سنجی MTT:

اثر غلظت‌های مختلف MST-312 بر روی فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 با استفاده از روش رنگ سنجی MTT بررسی شد. MTT یک روش رنگ سنجی سریع، حساس و دقیق و بر پایه احیای نمک‌های تترازولیوم زرد رنگ [3-4,5 dimethyl thiazol-2-yL-]-2-5 diphenyltetra (Zolium bromide) به وسیله فعالیت‌های متابولیکی سلول زنده توسط آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد که در نتیجه فرآیند احیا، بلورهای بنفش رنگ فورمازان تشکیل می‌شود.

سپس این بلورها در حلال مناسب حل شده و به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری مقدار سنجی می‌شود. میزان بلور فورمازان ایجاد شده می‌تواند نشان دهنده درصد سلول‌های زنده باشد. روش کار بدین صورت انجام گرفت که سلول‌های NALM-6 (۱×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک) با غلظت‌های ۰، ۲، ۴و ۸ میکرومولار داروی MST-312 تیمار و به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. حجم نهایی هر چاهک µL ۱۰۰ بود. ۴۸ ساعت پس از تیمار، پلیت‌ها با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محیط چاهک‌ها با وارونه کردن پلیت خارج شد. µL ۱۰۰ محلول MTT (۰/۵ mg/mL در PBS فیلتر شده– سیگما آلدریچ، آمریکا) به هر چاهک اضافه و تکمه سلولی به آرامی در محلول MTT حل شد. پلیت ۹۶ خانه به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون، به منظور حل شدن بلورهای بنفش رنگ فورمازان، µL ۱۰۰ محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. پلیت با فویل آلمینیومی پوشانده و جهت ظاهر شدن رنگ به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر مخلوط شد. میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. در پایان، میزان فعالیت متابولیک(بقای سلولی) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

= درصد فعالیت متابولیک سلولی
۱۰۰× (جذب نوری کنترل / جذب نوری تست)

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

سنجش آپوپتوز:

اثـر داروی MST-312 بـر روی آپوپتـوز رده سـلولی NALM-6 بـه وسیلـه رنگ‌آمیزی هم زمان با آنکسـین-V و 7-AAD توسـط کیـت آپوپتـوز FITC آنکسـین -V (بیوساینس BD ، آمریکـا) Detection Kit II بررسـی شـد. سلول‌های NALM-6 در پلیت کشـت سـلول ۱۲ خانـه بـا تراکم ^{5} ۱۰×۲ سلول در هر خانه کشـت داده شـدند و بـا غلظت‌های مورد نظر(۰، ۲، ۴و ۸ میکرومـولار) MST-312 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند(حجم نهایی هـر چاهـک ۲ میلی‌لیتر بود). نمونه با غلظت ۰ میکرومولار مورد تیمار دارویی قرار گرفت و به عنوان کنترل منفـی اسـتفاده شـد. بعـد از اتمـام انکوباسـیون، محتویـات هـر چاهـک بـه فالکون‌های مجزا منتقل شد. به منظور جمع‌آوری سلول‌ها، سـانتریفوژ بـا دور rpm ۲۰۰۰ بـه مـدت ۵ دقیقـه انجـام گرفت. محیط رویی خارج و توده سلولی دو بـار بـا PBS شستشو داده شد(هر بار با ۱ میلـی‌لیتـر PBS و سـانتریفوژ با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه). پس از خارج کـردن PBS رویی به هر تـوده سـلولی، µL ۱۰۰ بایـنـدینگ بـافر (۱x)، µL ۵ آنکسین- FITC- V و µL ۵ محلـول رنـگ 7-AAD اضافه شد. پس از یک ورتکس ملایم، نمونه‌هـا بـه مدت ۱۵ دقیقه در تـاریکی انکوبـه شـدند. پـس از اتمـام انکوباسیون، µL ۴۰۰ بایندیگ بافر (۱x) بـه سوسپانسـیون سلولی اضافه و آنالیز با فلوسیتومتری انجام شد. برای هـر نمونه مشخصات ۱۰۰۰۰ سـلول ضـبط شـد و اطلاعـات خروجی دستگاه با استفاده از نـرم‌افـزار Cell Quest آنـالیز گردید. سلول‌هـایی کـه آنکسـین مثبـت و 7-AAD منفـی بودند، در فاز اولیه آپوپتوز و سلول‌هایی که هم آنکسین و هم 7-AAD مثبت بودند به عنوان سـلول‌هـای فـاز نهـایی آپوپتوز در نظر گرفته شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

پس از ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با دوز ۴ میکرو مولار MST-312، RNA سلول به صورت دستی و با استفاده از محلول جداسازی Tri-pure (رُوش- Tri-pure isolation Reagent) استخراج شد.به طور خلاصه سلول‌ها با مقدار تقریبی ^{6} ۱۰ × ۵ سلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به توده سلولی یک میلی‌لیتر از محلول Tripure اضافه شده و سلول‌ها با استفاده از پیپتاژ و حرکت محکم دست لیز شدند. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کلروفرم اضافه شده و پس از بستن درب میکروتیوب به مدت ۳۰ ثانیه با حرکت محکم دست تکان داده شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۲۰۰ سانتریفوژ شدند. در این مرحله ۳ فاز تشکیل شد، فاز رویی که شامل RNA می‌باشد برداشته شده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۲۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع رویی خالی و به رسوب RNA ، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ اضافه گردید. میکروتیوب‌ها چندین مرتبه سروته شدند و سپس ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ اعمال شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور rpm ۷۵۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس مایع رویی تخلیه، رسوب خشک و در ۲۰ میکرولیتر آب DEPC (DEPC Treated سیگما، آلدریچ، Water) حل شد و در پایان ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ و ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد همراه با حرکت ملایم انجام گرفت. کمیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر و به وسیله میزان جذب نمونه‌ها در طول موج nm ۲۶۰ اندازه‌گیری شد. از نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نیز برای بررسی میزان خلوص RNA استفاده شد که دامنه بین ۱ تا ۲ به عنوان بهترین خلوص در نظر گرفته می‌شود. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، نمونه RNA بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد. چنانچه RNA کیفیت مطلوبی داشته باشد بایستی باندهای S ۲۸ و S ۱۸ مربوط به RNA ریبوزومی(rRNA) مشاهده شوند. به منظور حذف آلودگی DNA از RNA از کیت DNase Treatment (فرمنتاز) استفاده شد. به طوری که به ازای هر نمونه، ۱ میکروگرم از RNA به همراه ۱ میکرولیتر buffer ۱۰X DNase I Reaction و ۱ میکرولیتر DNase I با آب

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

عاری از نوکلئاز به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد.

در نهایت، ۱ میکرولیتر از محلول ۵۰ میلی‌مول EDTA برای توقف واکنش افزوده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه قرار داده شد. برای ساخت cDNA از کیت ساخت DNA مکمل (RevertAid First Strand DNA complementary DNA (cDNA) Synthesis kit from Fermentas) تهیه شد. این کیت امکان ساخت DNA از روی RNA را فراهم می‌کند. در این مرحله به محصول واکنش DNase Treatment که حاوی ۱۱ میکرولیتر RNA می‌باشد، ۹ میکرولیتر از مستر تهیه شده اضافه شد و حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسید(جدول ۱). برای مطمئن شدن از ساخت cDNA ، واکنش PCR برای ژن بتااکتین انجام گرفت و سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ران شد. حضور باند مربوط به تکثیر بتا اکتین مشاهده شد، که دال بر حضور الگوی DNA و ساخت cDNA می‌باشد.

واکنش کمی Real Time PCR:

واکنش Real Time PCR به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌های BaX و Bcl2 در گروه تیمار شده و کنترل بعد از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312 انجام شد.

مستر میکس ۲X گرین(Real Q Plus 2x Master Mix آمپلیکون ـ گرین) برای انجام واکنش Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفت(جداول ۴-۲).

جدول ۱: مستر میکس تهیه شده برای واکنش ترانس کریپتاز معکوس Transcription

حجم مورد نیاز (میکرولیتر)	ماده مورد استفاده
۴	Reaction Buffer ۵ X
۱	Random ۶ mers (۱۰۰ µM)
۲	dNTP (۱۰ mM)
۱	Ribolock Rnase Inhibitor ۱ (۲۰ U/µL)
۱	RevertAid M-Mul V (۲۰۰ U/µL)
دما و زمان واکنش در ترموسایکلر بر اساس کیت: • ۲۵ درجه به مدت ۵ دقیقه • ۴۲ درجه به مدت ۱ ساعت • ۷۰ درجه به مدت ۵ دقیقه	

جدول ۲: نحوه تهیه مسترمیکس واکنش Real Time PCR

حجم مورد نیاز (میکرولیتر)	ماده مورد استفاده
۵	مستر میکس گرین ۲ X (آمپلیکون)
۰/۵	آغازگر جلوبرنده
۰/۵	آغازگر معکوس
۰/۵	cDNA
۳/۵	آب تهی از نوکلئاز

جدول ۳: برنامه مورد استفاده برای واکنش Real Time PCR

مرحله واکنش	دما درجه سانتی‌گراد	زمان(ثانیه)	تعداد چرخه
فعال‌سازی اولیه	۹۵	۹۰۰	۱ چرخه
فعال‌سازی اولیه	۹۵	۱۵	۴۰ چرخه
طویل‌سازی	۶۵	۶۰	

جدول ۴: توالی آغازگرهای معکوس و جلوبرنده ژن‌های Bax ، Bcl-2 و β actin

نام ژن	توالی آغازگر جلوبرنده	توالی آغازگر معکوس
β actin	CCAACCGCGAGAAGATGA	TCCATCACGATGCCAGTG
Bax	AGGATCGAGCAGGGCGAATG	TCAGCTTCTTGGTGGACGCA
Bcl-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAG	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG

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

واکنش در دستگاه روتور ژن Q (کیاژن) انجام و با استفاده از نرم‌افزار REST ، داده‌های حاصل از آن آنالیز گردید. برای تایید اختصاصی بودن محصولات تولید شده، آنالیز منحنی ذوب (melting curve) صورت گرفت. در این آنالیز محصولاتی که دارای طول و توالی یکسانی باشند دمای ذوب مشابهی داشته و منحنی ذوب آن‌ها روی هم قرار می‌گیرد. از ژن بتااکتین به عنوان ژن کنترل داخلی(House keeping) جهت نرمالیزه کردن نتایج بیان ژن‌ها استفاده شد. بیان هر ژن سه بار تکرار گردید و بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش مقایسه‌ای ΔΔCT طبق فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

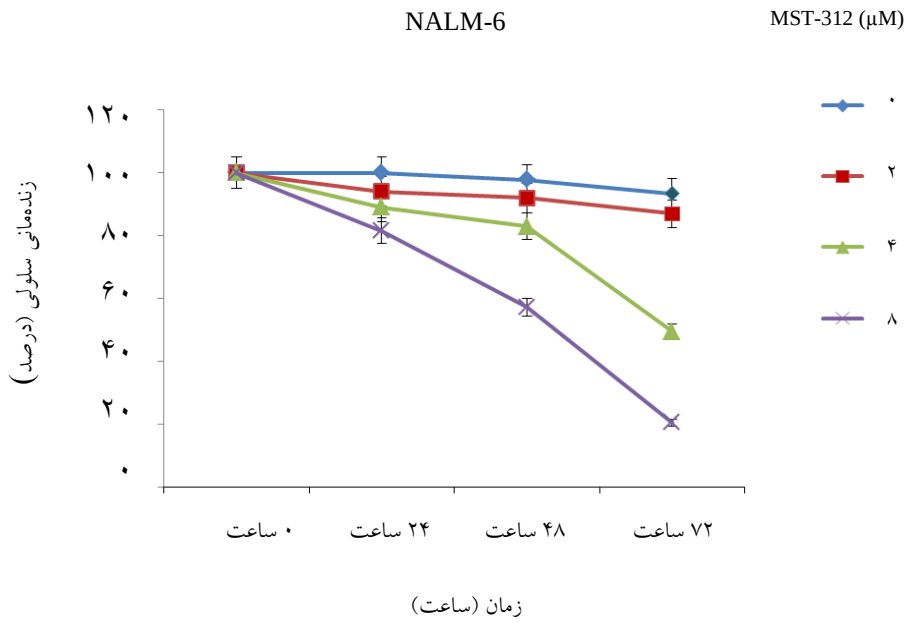
آنالیز آماری:

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها به نرم‌افزار SPSS ۲۲ وارد و توسط آزمون آماری paired-samples T Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها

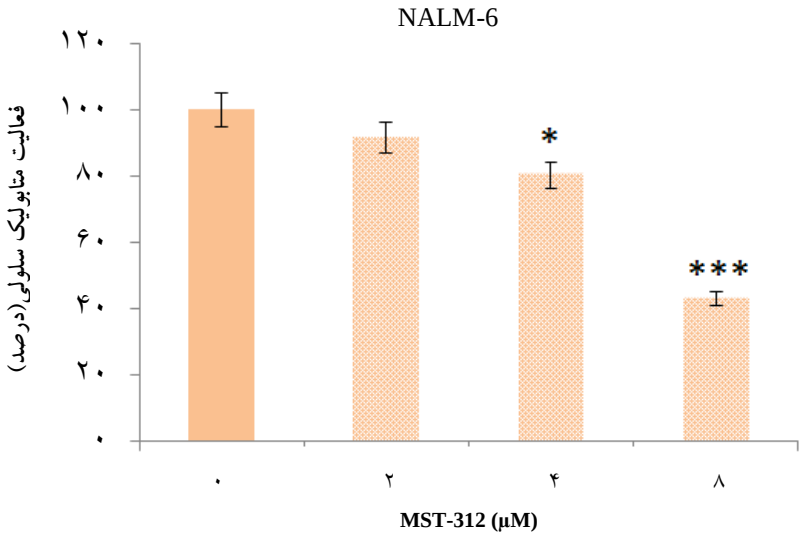
سنجش زنده‌مانی سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312 :

تاثیر غلظت‌های مختلف MST-312 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی زنده‌مانی سلول‌های رده سلولی NALM-6 با آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو بررسی گردید. نتایج نشان داد که زنده‌مانی این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان به طور قابل توجهی کاهش یافت. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸ میکرومولار MST-312 ، در طول ۴۸ ساعت، بیش از ۵۰٪ کاهش زنده‌مانی نشان دادند($p< ۰/۰۰۱$). از آن جایی که به دنبال مواجه سلول‌ها با MST-312 در طول ۲۴ ساعت اثر قابل توجهی بر روی زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده نشد، هم چنین در طول ۷۲ ساعت سلول‌ها با کاهش شدید زنده‌مانی مواجهه شدند، زمان ۴۸ ساعت به عنوان زمان مناسب برای سایر آزمایش‌ها انتخاب شد(نمودار ۱).

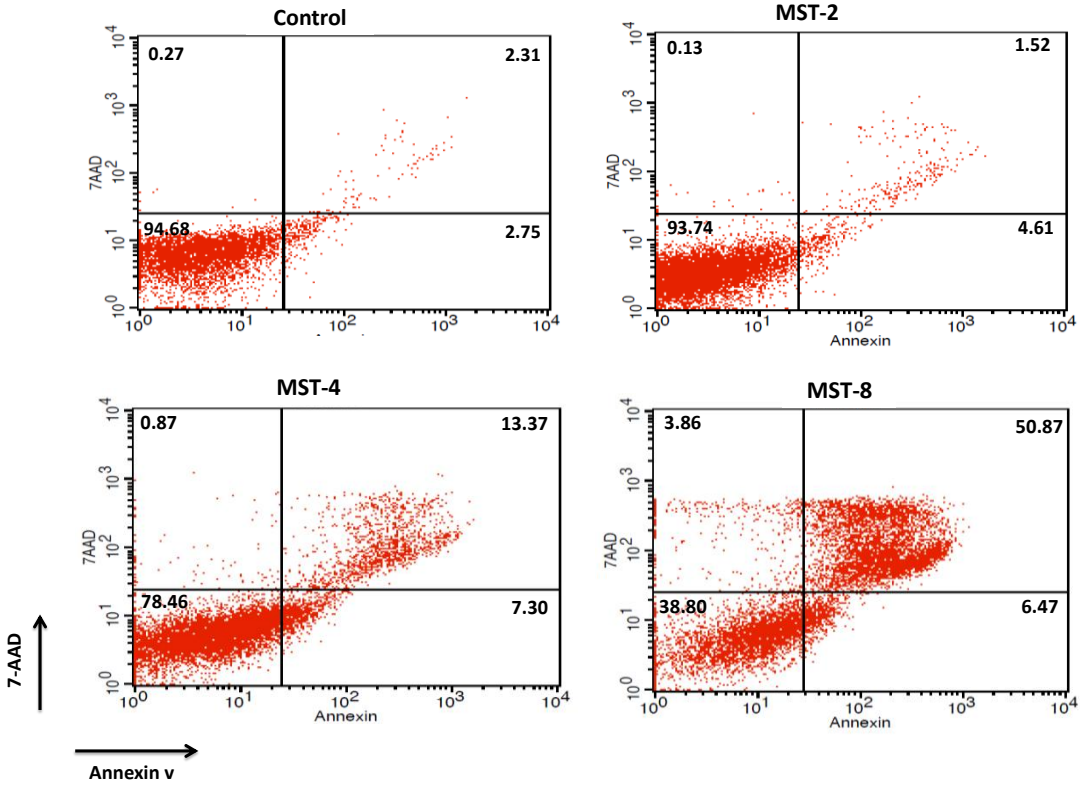


نمودار ۱: MST-312 باعث کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های NALM-6 می‌شود. سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف MST-312 مواجه شدند و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه، زنده‌مانی سلولی با آزمون دفع رنگ تریپان‌بلو، بررسی شد. زنده‌مانی سلول‌های NALM-6، پس از تیمار کوتاه مدت با MST-312 به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافت.

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

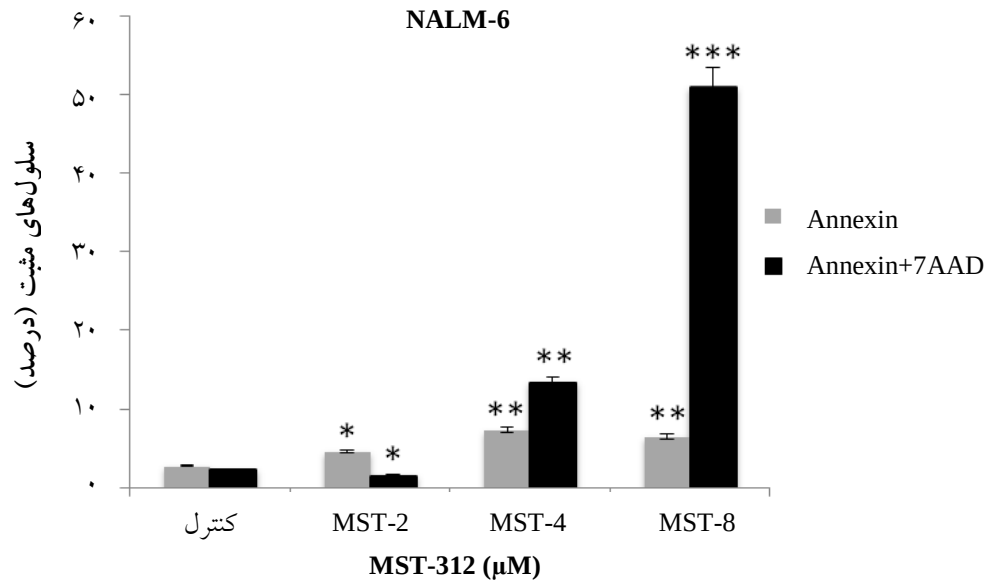


نمودار ۲: MST-312 باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 می‌شود. سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف MST-312 تیمار شدند و بعد از ۴۸ ساعت فعالیت متابولیک سلولی با آزمون رنگ‌سنجی MTT بررسی شد. فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 مواجهه شده با MST-312 به طور قابل توجهی به صورت وابسته به دوز کاهش یافت(۰/۰۵ >p * و ۰/۰۰۱ >p *).**



شکل ۱: سلول‌های NALM-6 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۴ میکرومولار MST-312 ، از نظر اتصال به آنکسین-V/ 7AAD مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های آنکسین منفی/7AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده، سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD منفی به عنوان سلول‌های مراحل اولیه آپوپتوز، سلول‌های آنکسین مثبت/ 7AAD مثبت به عنوان سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز و سلول‌های آنکسین منفی/ 7AAD مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک تلقی شدند.

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



نمودار ۳: اثر آپوپتوزی وابسته به دوز MST-312 بر رده سلولی NALM-6 مشاهده شد. MST-312 بر آپوپتوز رده سلولی NALM-6. سلول‌های NALM-6 به مدت ۴۸ ساعت با دوزهای مختلف MST-312 تیمار شدند. سپس این سلول‌ها از نظر اتصال به آنکسین-v/7AAD مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های آنکسین منفی/7AAD منفی به عنوان سلول‌های زنده، سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD منفی به عنوان سلول‌های مراحل اولیه آپوپتوز، سلول‌های آنکسین مثبت/ 7AAD مثبت به عنوان سلول‌های مراحل انتهایی آپوپتوز و سلول‌های آنکسین منفی/7AAD مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک تلقی شدند. تقریباً ۲۰٪ آپوپتوز در مواجهه ۴۸ ساعته با غلظت ۴ میکرومولار مشاهده شد. نتیجه از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است (p< ۰/۰۵ *، p< ۰/۰۱ ** و p< ۰/۰۰۱ *).**

سنجش فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

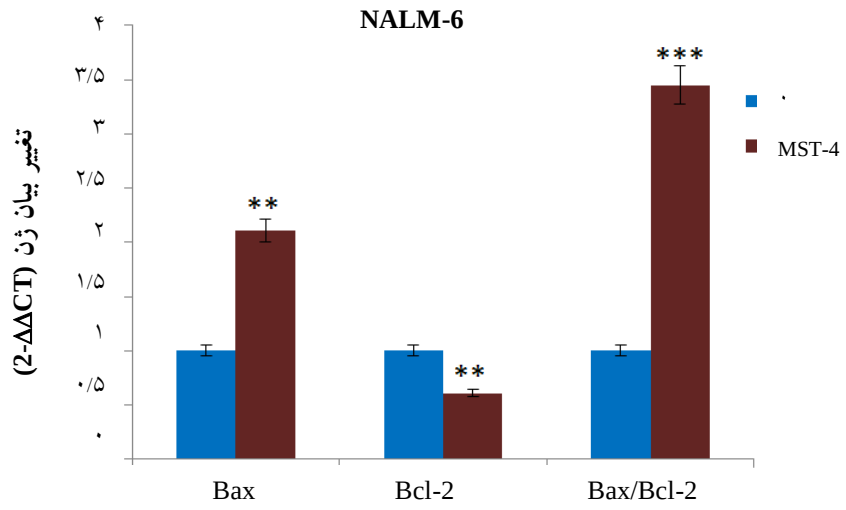
به منظور بررسی اثر دوزهای مختلف MST-312 بر روی فعالیت متابولیک سلول‌های NALM-6 ، از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد(نمودار ۲). همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، فعالیت متابولیک سلول‌ها که نشان‌دهنده میزان سلول‌های زنده است، به طور قابل توجهی در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف MST-312 در طول ۴۸ ساعت کاهش یافت که نشان‌دهنده اثر کشندگی وابسته به دوز MST-312 بر روی این سلول‌ها می‌باشد. به طوری که در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار، میزان فعالیت متابولیک سلولی به ترتیب ۶، ۱۹/۶۹ و ۵۶/۹ درصد کاهش پیدا کرد که این کاهش در دوزهای ۴ و ۸ به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (مقادیر p< ۰/۰۵ و p< ۰/۰۰۱ به ترتیب برای دوزهای ۴ و ۸ میکرومولار MST-312).

سنجش میزان آپوپتوز سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

بعد از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ میکرومولار، از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II به منظور بررسی اثر MST-312 بر روی آپوپتوز سلول‌های NALM-6 استفاده شد. سلول‌هایی که آنکسین و 7-AAD منفی بودند به عنوان سلول‌های زنده، سلول‌هایی که آنکسین مثبت و 7-AAD منفی بودند به عنوان سلول‌های مرحله اولیه آپوپتوز، سلول‌هایی که برای آنکسین و 7-AAD مثبت بودند به عنوان سلول‌های مراحل نهایی آپوپتوز و سلول‌های آنکسین منفی و 7-AAD مثبت به عنوان سلول‌های نکروتیک در نظر گرفته شدند(شکل ۱).

انکوباسیون کوتاه مدت با MST-312 به طور مشخص سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD منفی و سلول‌های آنکسین مثبت/7AAD مثبت را افزایش می‌دهد که

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



نمودار ۴: MST-312 ، بیان ژن *Bcl2* را کاهش و بیان ژن *Bax* و نسبت *Bax/Bcl2* را افزایش می‌دهد. پس از ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312، RNA سلول‌ها استخراج و cDNA ساخت شد. نتایج Real Time PCR به روش سایبرگرین و با نشانگرهای اختصاصی نشان داده شده است. مقادیر با بیان ژن *βactin* نرمالیزه شده‌اند(۰/۰۱ >p ** و ۰/۰۰۱ >p *).**

نشان‌دهنده تاثیر آپوپتوتیک این دارو بر سلول‌های NALM-6 می‌باشد(نمودار ۳). همان طور که در نمودار۳ مشاهده می‌شود، غلظت ۴میکرومولار که با آپوپتوز قابل توجهی همراه بود، به عنوان غلظت مورد نظر برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت((۰/۰۱ > p).

بررسی سطح بیان ژن پیش‌آپوپتوزی Bax و ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 در سلول‌های NALM-6 بعد از تیمار با MST-312:

به منظور بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز شامل *Bax* و *Bcl-2* ، از غلظت ۴ میکرومولار MST-312 که در بررسی فلوسایتومتری با آپوپتوز قابل توجهی همراه بود استفاده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت ۴ میکرومولار MST-312 ، افزایش ۲/۱۱ برابری بیان ژن *Bax* و کاهش ۰/۶۱ برابری بیان ژن *Bcl2* در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد(۰/۰۱ >p). هم چنین نسبت *Bax/Bcl-2* افزایش ۳/۴۵ برابری(۰/۰۰۱ >p)(نمودار ۴). نسبت به گروه کنترل نشان داد که تاییدی بر آپوپتوز القا شده توسط MST-312 در این سلول‌ها است(۰/۰۰۱ >p).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تیمار ۴۸ ساعته با MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی، کاهش فعالیت متابولیک سلولی و افزایش آپوپتوز سلولی در رده سلولی NALM-6 می‌شود. در حال حاضر انتخاب یک ویژگی مشخص در سلول‌های سرطانی که بتواند به عنوان شاخصی برای درمان هدفمند سرطان مورد استفاده قرار گیرد، از اهمیت به سزایی برخوردار است. یکی از ویژگی‌های اختصاصی در اکثر سرطان‌ها، بیان بالای آنزیم تلومراز است که با بازسازی توالی تلومر به سلول قدرت نامیرایی و تکثیر نامحدود می‌دهد(۱۱). از آن جایی که سلول طبیعی تقریباً فاقد فعالیت آنزیم تلومراز است، در نتیجه استفاده از عوامل مهار کننده تلومراز نمی‌تواند روی این سلول‌ها اثر ویژه‌ای داشته باشد، در حالی که تلومراز در ۹۰٪-۸۵٪ سرطان‌های انسانی دوباره فعال می‌شود و با توجه به نیاز سلول‌های سرطانی به سطح بالای آنزیم تلومراز برای ادامه روند تکثیر و نقش به سزای آن در روند تومورزایی، تلومراز می‌تواند یک هدف مناسب در درمان و مهار سرطان به حساب آید(۱۲). ازجمله در لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL)، سطح فعالیت آنزیم تلومراز در نمونه مغز استخوان گرفته شده از بیماران در زمان

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

تشخیص یا در زمان عود مجدد، به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه افراد طبیعی است و تلومراز به عنوان یک مارکر بدخیمی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد تلقی می‌شود(۱۵، ۱۴). در حال حاضر انواع مهارکننده‌های تلومراز به تنهایی یا در ترکیب با داروهای دیگر در فازهای I و II کارآزمایی‌های بالینی جهت درمان انواع سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند(۲۳-۲۱). MST-312 که مهارکننده تلومراز شماره ۹ نام دارد، یک ترکیب مشتق شده از چای سبز است که به صورت وابسته به دوز باعث مهار آنزیم تلومراز شده و سلول را به سمت مرگ سوق می‌دهد(۱۷). در مطالعه‌های پیشین بر روی تومورهای مغزی و ریه، دو اثر متفاوت وابسته به زمان از MST-312 نشان داده شده است. یک اثر کوتاه مدت که به دنبال مواجه کوتاه مدت(برای مثال ۷۲ ساعته) رخ می‌دهد و همراه با آسیب به DNA ، توقف چرخه سلولی در مراحل G2/M و کاهش زنده‌مانی سلولی است. این اثر به دلیل تخریب کمپلکس تلومراز و برداشته شدن اثر پوششی تلومراز از روی DNA تلومر و درنتیجه شناسایی تلومر به عنوان یک دورشته آزاد توسط مسیر کینازی ATM ایجاد می‌شود. اثر طولانی مدت(بیش از ۱/۵ ماه) به دنبال مواجه طولانی مدت و در اثر عدم جبران طول تلومر توسط تلومراز و کوتاه شدن تلومر رخ می‌دهد (۲۶-۲۴).

به علاوه مطالعه‌های قبلی ما در مواجه کوتاه مدت سلول‌ها با MST-312، بیانگر اثر آپوپتوتیک وابسته به دوز و زمان MST-312 بر روی رده‌های سلولی میلوم مالتیپل (U266) و لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (NB4 و HL60) بود. هم چنین نتیجه بررسی آنالیز چرخه سلولی در سلول‌های تیمار شده با MST-312 تاییدکننده توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M در رده‌های سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد بود. علاوه بر این هیچ گونه اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوزی از این مهارکننده بر روی جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی فرد سالم (PBMC) در مواجهه مشابه از نظر غلظت و زمان مشاهده نشد. این موضوع نشان‌دهنده اثر اختصاصی تومور MST-312 می‌باشد(۱۸).

هم چنین بررسی اثر MST-312 بر روی رده سلولی سرطان کولورکتال توسط S سیونگ و همکارانش نشان داد MST-312 باعث کاهش فعالیت متابولیک، کاهش قابل توجه جمعیت سلول‌های سرطانی و آپوپتوز سلولی می‌شود. اثر MST-312 در ترکیب با داروی موترین باعث افزایش قابل توجه تاثیر این دارو بر رده سلولی سرطان کولورکتال شد(۲۷). در مطالعه دیگری که توسط گورانگ و همکارانش انجام شد، MST-312 باعث کاهش قابل توجه فعالیت تلومراز و توقف رشد در سلول‌های سرطان سینه شد(۲۸). سیمیا و همکارانش نشان دادند MST-312 باعث کوتاه شدن طول تلومر و مهار رشد سلول‌های سرطانی و به عنوان کاندیدی قابل اعتماد برای هدف قرار دادن تلومراز معرفی گردید(۲۹).

در مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر مهارکننده تلومراز MST-312 بر روی رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6)، که در مطالعه‌های گذشته بیان بالایی از آنزیم تلومراز در این رده سلولی گزارش شده است، سلول‌های NALM-6 تحت تیمار کوتاه مدت(۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته) با غلظت‌های مختلف MST-312 قرار گرفتند و زنده‌مانی سلولی در زمان‌های معین سنجیده شد(۲۰، ۱۹). با توجه به این که در زمان ۲۴ ساعت اثر قابل توجهی بر روی زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده نشد، هم چنین در زمان ۷۲ ساعت میزان زنده‌مانی سلولی به صورت چشمگیری کاهش داشت، زمان ۴۸ ساعت به منظور بررسی‌های بیشتر انتخاب شد. نتایج ما نشان داد که تیمار کوتاه مدت با MST-312 موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. هم چنین بررسی فعالیت متابولیک سلولی به دنبال تیمار ۴۸ ساعته با MST-312، به صورت قابل توجهی کاهش می‌یابد. از طرفی MST-312 باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها شده که این آپوپتوز در سطح ژن با افزایش ژن آپوپتوزی *Bax* و ژن ضد آپوپتوزی *Bcl-2* نیز تایید شد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعه‌های مشابه در تحت تاثیر قرار دادن سلول‌های سرطانی به صورت اختصاصی به واسطه مهارکننده‌های تلومراز و از جمله MST-312 و هم چنین با توجه به نقش موثر

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

تلومراز در روند بدخیمی‌ها از جمله لوسمی لنفوبلاستیک حاد، MST-312 می‌تواند به عنوان کاندیدی در درمان ALL پیشنهاد شود.

نتیجه‌گیری

تیمار کوتاه مدت سلول‌های سرطانی NALM-6 با MST-312 باعث کاهش زنده‌مانی، فعالیت متابولیک و افزایش آپوپتوز سلولی می‌شود. با توجه به نتایج این مطالعه، MST-312 با مهار تلومراز و القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 می‌تواند به عنوان کاندیدی در درمان ALL پیشنهاد شود.

References:

1- Mei L, Ontiveros EP, Grif EA, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Blood Reviews Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. Blood Rev 2015; 29(4): 243-9.
2- Nesheli HM, Moghaddam TG, Zahedpasha Y, Norouzi AR. Acute Lymphoblastic Leukemia with Eosinophilia and Strongyloides stercoralis Hyperinfection Case Presentation. Iran J Pediatr 2011; 21(4): 549-52.
3- Pahloosye A, Hashemi A, Mirmohammadi SJ, Atefi A. Presenting Clinical and Laboratory Data of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Iran J Pediatr Hematol Oncol 2011; 1(3): 71-7.
4- Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood Cancer J 2017; 7(6): e577.
5- Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnett D. Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2010; 95(9): 1608-11.
6- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2013; 381(9881): 1943-55.
7- Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2015; 121(15): 2517-28.
8- Kato M, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Int 2018; 60(1): 4-12.
9- Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: A report from the children's oncology group. J Clin Oncol 2012; 30(14): 1663-9.
10- Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman PV, Harris MH, Stevenson K, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. Nat Commun 2014; 5: 3469.
11- Dong X, Liu A, Zer C, Feng J, Zhen Z, Yang M, et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells. BMC Cancer 2009; 9: 133.
12- Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. Cancer Treat Rev 2013; 39(5): 444-56.
13- Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). Int J Oncol 2012; 41(5): 1561-9.
14- Kustanovich AM, Savitskaya TV, Potapnev MP. Telomerase Activity and Telomere Length in Malignant Cells of Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. Exp Oncol 2003; 25(1): 69-73.
15- Plasschaert SLA, Kamps WA, Vellenga E, de Vries EGE, de Bont ESJM. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: A question of maturation? Cancer Treat Rev 2004; 30(1): 37-51.
16- Schneider WC. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J Biol Chem 1945; 161: 293-303.
17- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai E V, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(21): 10114-8.
18- Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-κB pathway. Tumour Biol 2015; 36(11): 8425-37.
19- Kanno S, Kitajima Y, Kakuta M, Osanai Y, Kurauchi K, Ujibe M, et al. Costunolide-induced apoptosis is caused by receptor-mediated pathway and inhibition of telomerase activity in NALM-6 cells. Biol Pharm Bull 2008; 31(5): 1024-8.
20- Bashash D, Zareii M, Safaroghli-Azar A, Omrani MD, Ghaffari SH. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. Hematology 2017; 22(6): 330–40.
21- Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, Fernandez-Marcelo T, Iniesta P, Ortiz-de-Solorzano C, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. Mol Cancer 2011; 10: 96.
22- Gurung RL, Lim HK, Venkatesan S, Lee PSW, Hande

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

MP. Targeting DNA-PKcs and telomerase in brain tumour cells. Mol Cancer 2014; 13: 232.
23- Baerlocher GM, Oppliger Leibundgut E, Ottmann OG, Spitzer G, Odenike O, McDevitt MA, et al. Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. N Engl J Med 2015; 373(10): 920-8.
24- Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. Cancer Cell 2002; 2(4): 257-65.
25- Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. Crit Rev Oncol Hematol 2006; 57(3): 191-214.
26- Wong VCH, Ma J, Hawkins CE. Telomerase inhibition induces acute ATM-dependent growth arrest in human astrocytomas. Cancer Lett 2009; 274(1): 151-9.
27- Chung SS, Oliva B, Dwabe S, Vadgama JV. Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST-312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. Int J Oncol 2016; 49(2): 487-98.
28- Gurung RL, Lim SN, Low GKM, Hande MP. MST-312 alters telomere dynamics, gene expression profiles and growth in human breast cancer cells. J Nutrigenet Nutrigenomics 2014; 7(4-6): 283-98.
29- Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K, et al. Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. Mol Cancer Ther 2002; 1(9): 657-65.

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

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2018; 15(2): 120-132

Original Article

The effect of telomerase inhibitor MST-312 on apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cell line NALM-6

Ghasemimehr N.[1], Yazdani Z.[1], Farsinejad A.R.[1], Mirzaee Khalilabadi R.[1], Fatemi A.[1]

[1]Department of Hematology and Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract

Background and Objectives

There have been continuous efforts in telomerase-targeted therapy for cancer treatment because telomerase expression is significantly increased in about 85- 90% of human cancers while its expression is usually silenced in normal cells.

Materials and Methods

Throughout this experimental study, NALM-6 cells were treated with different concentrations of telomerase inhibitor, MST-312 at different times. Then, cell viability and metabolic activity were evaluated by trypan blue and MTT assays; cell apoptosis was also evaluated by flow cytometry using Annexin V Apoptosis Detection Kit. In addition, the expression of BAX and BCL2 genes was evaluated in the treated cells using Quantitative Real-time PCR.

Results

A dose-and time-dependent decrease was observed in the viability of NALM-6 cells after exposure with different concentration of MST-312. Over 50% decrease was observed in the viability of the cells treated with 8 µM of MST-312 after 48 h. The cytotoxic effect of MST-312 was dose- dependent, with approximately 6, 19.69 and 56.9% reduction in metabolic activity of NALM-6 cells after 48 h exposure with 2, 4, and 8 µM of MST-312, respectively. Approximately 20% apoptosis was observed in NALM-6 cells treated with 4µM of MST-312 after 48 h. Gene expression analysis also showed that 4µM of MST-312 led to upregulation of BAX and downregulation of Bcl-2 genes.

Conclusions

Inhibition of telomerase activity by MST-312 can be proposed as a new candidate for the treatment of acute lymphoblastic leukemia.

Key words: Telomerase, Apoptosis, Acute Lymphoid Leukemia

Received: 8 Apr 2018
Accepted: 9 May 2018

Correspondence: Fatemi A., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Department of Hematology and Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences.
Postal Code: 7619794435, Kerman, Iran. Tel: (+9834) 32112007; Fax: (+9834) 31325375
E-mail: *ahmad.fatemi2@gmail.com*

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