خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۳ پاییز ۸۹ (۱۴۷-۱۳۸)

مقاله پژوهشی

تاثیر داروی آرسنیک تری‌اکسید بر بیان ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز در رده سلولی لوکمیای پرومیلوسیتیکی حاد

مائده شریفی‌زاده[۱]، مهرداد هاشمی[۲]، مجید مؤمنی[۳]، کامران علی مقدم[۴]، اردشیر قوام‌زاده[۵]، حمیداله غفاری[۶]

چکیده

سابقه و هدف

لوکمی پرومیلوسیتیکی حاد(APL)، بدخیم‌ترین نوع لوکمیای حاد است که در عرض چند هفته باعث مرگ می‌شود و حدود ۱۵-۱۰ درصد انواع لوکمی‌های میلوسیتیکی حاد را شامل می‌شود. آرسنیک تری‌اکسید به عنوان یک عامل درمانی منفرد، درمان برگزیده برای APL شناخته شده است که عمده اثر آن القای مرگ سلولی از طریق آپوپتوز است، اما مکانیسمی که با آن باعث القای آپوپتوز می‌شود و عمیقاً بیان ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد، هنوز به درستی شناسایی نشده است. از این رو بررسی تاثیر آن بر بیان ژن‌های درگیر در سرطان ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود. برای فهم مکانیسم‌های درگیر در القای مرگ سلولی توسط آرسنیک، رده سلولی NB4 با غلظت‌های ۰/۵μM، ۱ μM و ۲μM آرسنیک تری‌اکسید تیمار شدند و به ترتیب پس از زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت، RNA آن‌ها استخراج شد. پس از سنتز cDNA ، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی در مسیر میتوکندریایی شامل کاسپاز۳ ، Mcl-1 و Bcl-2 با روش Real-Time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. از آزمون t ، نرم‌افزار Excel و آنالیز واریانس برای تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

یافته‌های ما نشان داد که القای مرگ توسط آرسنیک، با کاهش بیان mRNA آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 همراه است اما بیان ژن‌های کاسپاز۳ و Mcl-1 پس از تیمار با آرسنیک تغییری نمی‌کند.

نتیجه گیری

این نتایج نشان می‌دهد که تغییر در بیان ژن Bcl-2 می‌تواند یکی از مکانیسم‌های عمل آرسنیک از طریق القای آپوپتوز باشد در حالی که ژن‌های کاسپاز۳ و Mcl-1 نقشی در آن ندارند.

کلمات کلیدی: لوکمیای پرومیلوسیتیکی حاد، آرسنیک تری‌اکسید، آپوپتوز، کاسپاز ۳، ژن‌های bcl-2

تاریخ دریافت : ۸۸/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش : ۸۹/ ۴/۲۳

۱ـ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲- PhD ژنتیک مولکولی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
۳ـ کارشناس ارشد ژنتیک ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵ـ فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶ـ مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ کارگر شمالی ـ کدپستی: ۱۴۱۱۱

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

مقدمه

Acute Promyelocytic Leukemia که به طور معمول APL گفته می‌شود، یکی از سرطان‌های خونی است که در اثر نقص در بلوغ گلبول‌های سفید در رده میلوئیدی به وجود می‌آید و باعث تجمع سلول‌های نابالغی به نام پرومیلوسیت می‌شود. بر اساس طبقه‌بندی FBA (French-American-British)، APL یکی از انواع AML (نوع M3) می باشد و اولین بار در سال ۱۹۵۷ توسط Leif Hillestad ، ماهیت آن به عنوان یک بیماری مستقل شناسایی شد. APL حدود ۱۵-۱۰ درصد انواع AML را شامل می‌شود و معمولاً در سنین ۵۰-۴۰ سالگی رخ می‌دهد(۲، ۱).

علت شایع ALP ،(بیش از ۹۵ درصد موارد) ترانسلوکاسیونی است که بین کروموزوم ۱۵ و ۱۷ اتفاق می‌افتد. شکستگی در کروموزوم ۱۵ در ژن PML (Promyelocytic Leukemia) که یک فاکتور رونویسی سرکوب‌کننده رشد را کد می‌کند و در کروموزوم ۱۷ در ژن RARα (Retinoic Acid Receptor Alpha) که تمایز رده میلوئیدی را کنترل می‌کند، رخ می‌دهد. حاصل این ترانسلوکاسیون، ایجاد ژن فیوژن PML-RARα است که یک پروتئین کایمریک تولید می‌کند. این پروتئین باعث مهار بلوغ سلول‌های میلوئیدی در مرحله پرومیلوسیتی می‌شود و تمایز نهایی سلول را مختل می‌کند(۴، ۳).

APL یک بیماری تهاجمی با وقوع ناگهانی است. خطر بالای مرگ زود هنگام در اثر بیماری(۲۰-۱۰ درصد) و پتانسیل قابل درمان بودن آن به میزان بالا (بیش از ۸۰ درصد)، اهمیت شناسایی به موقع و آغاز سریع درمان را می‌رساند(۵). از تعداد کل ۹۴۶ مورد سرطان دستگاه خونساز ثبت شده در بین زنان در سال ۱۳۸۳ ، فراوانی APL با ۲۱ نفر، ۲/۲۲ درصد بود. این سرطان در بین انواع دیگر سرطان‌های دستگاه خونساز در زنان در رتبه هشتم قرار گرفت. از تعداد کل ۱۵۴۹ مورد سرطان دستگاه خونساز گزارش شده در سال ۱۳۸۳ در بین مردان، فراوانی APL با ۲۱ مرد مبتلا، ۱/۳۶ درصد بود که در رتبه دهم قرار می‌گرفت(۷، ۶).

APL موقعیتی فوق‌العاده برای مرتبط ساختن علوم پایه و پزشکی می‌باشد و در پایه‌گذاری درمان‌های جدیدی مثل Differentiation Therapy بسیار اهمیت دارد. درمان APL با سایر انواع AML متفاوت است. امروزه اکثر بیماران APL با ATRA (All-Trans Retinoic Acid) درمان می‌شوند که باعث فعال کردن رسپتور رتینوئیک اسید و تمایز پرومیلوسیت‌ها می‌شود. با این وجود در حال حاضر عود بیماری و مقاومت به درمان، بزرگ‌ترین مشکل در مورد APL است(۸). بنابراین بررسی داروهای جدید علیه APL ضروری می‌باشد. آرسنیک تری‌اکسید (ATO) به عنوان درمان برگزیده برای APL شناخته شده است. ATO به عنوان یک عامل درمانی منفرد(بدون نیاز به ATRA و سایر داروهای شیمی درمانی) می‌تواند باعث القای رمیسیون کامل (Complete Remission = CR) در بیماران APL شود(۹). استفاده از آرسنیک از اوایل دهه ۱۹۹۰ توانست در درمان بیماران عود یافته به خوبی مفید واقع شود (۱۰). آرسنیک تری‌اکسید در غلظت‌های پایین(۰/۱-۰/۵ μM) از طریق تجزیه کردن پروتئین فیوژن PML-RAR ، باعث القای تمایز در پرومیلوسیت‌های سرطانی می‌شود، در حالی که در غلظت‌های بالا (۰/۵-۲ μM)، مسیرهای آپوپتوز پرومیلوسیت‌ها و سایر سلول‌های سرطانی را از طریق مکانیسم‌های مختلف هدف قرار می‌دهد. آپوپتوز در نتیجه یک برنامه ژنتیکی در سلول رخ می‌دهد که باعث حفظ هموستاز می‌شود و اختلال در آن می‌تواند منجر به بسیاری از بدخیمی‌ها از جمله APL شود(۱۲، ۱۱).

مکانیسم‌های مسؤول در القای آپوپتوز توسط آرسنیک هنوز به طور کامل شناسایی نشده است اما عمده اثر آرسنیک برای القای آپوپتوز، هدف گرفتن مسیر درونی آپوپتوز یا مسیر میتوکندریایی می‌باشد(۱۱). از این رو در این تحقیق به منظور فهم بیشتر چگونگی مکانیسم عمل آرسنیک، تصمیم گرفته شد بیان چندین ژن کلیدی در مسیر میتوکندریایی قبل و پس از درمان سلول‌ها با آرسنیک بررسی شود. این ژن‌ها عبارتند از: Bcl-2 , Mcl-1 و Caspase3.

مواد و روش ها

کشت سلولی:

مطالعه انجام شده در این پژوهش از نوع تحلیلی بود.

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

رده سلولی NB4 دارای ترانسلوکاسیون (15,17) t از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت ویال تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI -1640 (دارای ـــ L گلوتامین) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک(پنی‌سیلین و استرپتومایسین) و در انکوباتور ۳۷ ºC و ۵ درصد دی اکسید کربن رشد یافتند.

تیمار دارویی:

برای تیمار دارویی سلول‌ها، از آمپول‌های آرسنیک(سینا دارو، تهران) که غلظت آن‌ها ۵۰۰۰ µM است استفاده شد. به منظور تعیین اثرات بهینه دارو، ۲ متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی، با غلظت‌های ۰/۵ µM ، ۱ µM و ۲ µM آرسنیک تری‌اکسید تیمار شدند و به ترتیب پس از زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، RNA آن‌ها استخراج شد. بررسی‌های فارماکوکینتیکی نشان داده که این غلظت‌ها معادل وزن جرمی ۰/۱۵ mg/kg آرسنیک است که روزانه به بیمار تزریق می‌شود و بلافاصله پس از تزریق، یک پیک ۵/۵–۷/۵ µM ATO در پلاسما حاصل می‌کند که به سرعت به سطح پایدارتر ۱–۲ µM کاهش می‌یابد و محدوده درمانی ATO می‌باشد(۱۴، ۱۳).

استخراج RNA و سنتز cDNA:

استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری RNeasy (آلمان، کیاژن) Mini Kit انجام شد. RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز که حاوی اتیدیوم بروماید است و مشاهده دو باند مشخص ۱۸sو ۲۸s در موقعیت‌های ۸۰۰ و ۱۵۰۰ جفت باز مربوط به RNA های ریبوزومی کنترل شد. مقدار و غلظت RNA نیز با روش تعیین دانسیته نوری(OD) در طول موج‌های ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm اندازه‌گیری شد.

به منظور ساخت cDNA هایی با غلظت یکسان، ۱ µg از هر نمونه RNA با استفاده از کیت PrimeScript™ RT reagent ساخت شرکت تاکارا به cDNA ، رونویسی معکوس شد.

Real-Time PCR :

برای انجام Real-time PCR در این تحقیق از کیت SYBR® Green Premix Ex Taq ™ ساخت شرکت تاکارا و دستگاه light cycler (رُوش) استفاده شد. واکنش‌ها به صورت Hot start PCR انجام شد که مانع تکثیر غیر اختصاصی و تشکیل آغازگر دایمر قبل از شروع سیکل‌ها می‌شود. Real-Time PCR از نوع کمی نسبی (Relative quantification) صورت گرفت که درآن بیان ژن هدف در مقایسه با یک ژن خانه دار (Housekeeping gene) که در اینجا HPRT بود، به عنوان کنترل داخلی مقایسه شد(جدول ۱). چرخه دمایی به صورت یک مرحله فعال‌سازی اولیه آنزیم به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ °C بود که با ۴۵ سیکل شامل مرحله دناتوراسیون(۵ ثانیه در ۹۵ °C) و مرحله ترکیبی آنیلینگ/اکستنشن(۲۰ ثانیه در ۶۰ °C) ادامه می‌یافت. پس از آن مرحله منحنی دمای ذوب(melting curve) انجام شد تا از تکثیر اختصاصی رشته DNA هدف، اطمینان حاصل شود.

در پژوهش حاضر کلیه آزمایش‌ها با ۳ نمونه برای هر دوز و زمان انجام شد که با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار، میزان تغییرات محاسبه شد. از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای محاسبه بیان ژن هدف نسبت به ژن رفرانس و از آزمون t ، نرم‌افزار Excel و آنالیز واریانس برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

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

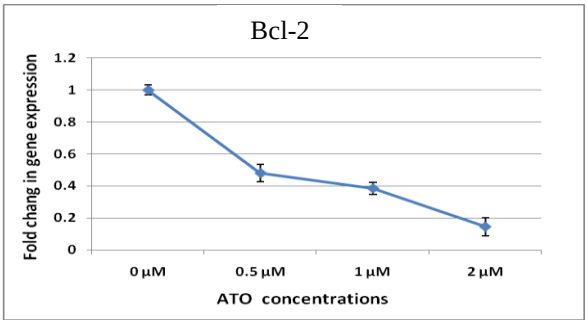
Gene Symbol	آغازگر جلوبرنده	آغازگر معکوس
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA
Bcl-2	GGGGAGGATTGTGGCCTTC	CAGGGCGATGTTGTCCACC
Casp3	ATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
Mcl-1	GTGCCTTTGTGGCTAAACACT	AGTCCCGTTTTGTCCTTACGA

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

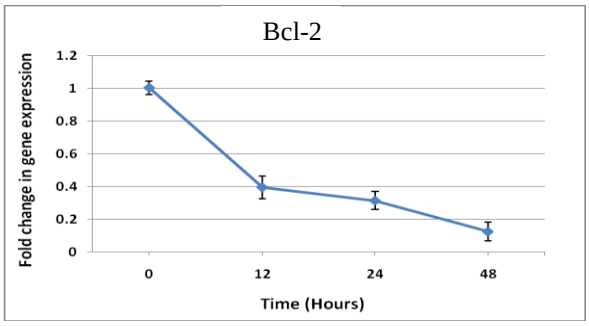
یافته ها

تغییرات در بیان ژن Bcl-2 :

نتایج به دست آمده در مورد ژن Bcl-2 حاصل از Real-time PCR با cDNA های سلول‌های تیمار شده در زمان ۴۸ ساعت به صورت dose-dependent و با cDNA های دوز ۲ µM به صورت Time-dependent می‌باشد. پس از تجزیه و تحلیل مقادیرCp (Crossing point) خوانده شده توسط دستگاه Light cycler ، نتایج به شکل منحنی زیر به دست آمد(نمودارهای۲ و ۱). چنانچه مشاهده می‌شود، بیان ژن Bcl-2 پس از تیمار سلول‌ها با آرسنیک تری‌اکسید هم به صورت dose-dependent و هم به صورت time-dependent کاهش چشمگیری نسبت به نمونه‌های تیمار نشده(نمونه صفر) داشته است.



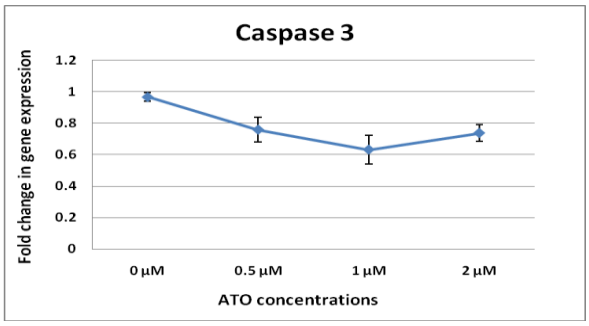
نمودار ۱: نمودار تغییر در بیان ژن Bcl-2 به صورت dose-dependent در سلول‌های NB4 تیمار شده با دوزهای مختلف آرسنیک پس از ۴۸ ساعت



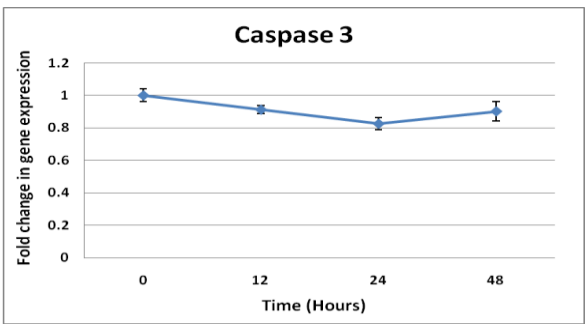
نمودار ۲: نمودار تغییر در بیان ژن Bcl-2 به صورت time-dependent در سلول‌های تیمار شده با دوز ۲ µM آرسنیک تری‌اکسید در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده که به خوبی نشان‌دهنده کاهش بیان ژن می‌باشد.

تغییرات در بیان ژن Caspase 3 :

برای بررسی بیان کاسپاز ۳ با روش Real-time PCR ، ابتدا با cDNA های زمان ۴۸ ساعت به صورت dose-dependent ، مراحل Real-time PCR انجام شد. پس از تجزیه و تحلیل مقادیر Cp ، نتایج به شکل منحنی زیر به دست آمد(نمودار ۳). سپس با cDNA های دوز ۲ µM به صورت Time-dependent ، مراحل Real-time PCR انجام شد و نتایج زیر حاصل شد(نمودار ۴). همان گونه که از این دو منحنی و آنالیز مقادیر cp بر می‌آید، بیان ژن کاسپاز ۳ پس از تیمار سلول‌ها با آرسنیک تری‌اکسید چه به صورت dose-dependent و چه به صورت time-dependent نسبت به نمونه‌های تیمار نشده(نمونه صفر) تغییری نمی‌کند.



نمودار ۳: منحنی بیان نسبی ژن کاسپاز ۳ . این منحنی نشان‌دهنده تغییر در بیان این ژن ۴۸ ساعت پس از مصرف آرسنیک تری‌اکسید با دوزهای متفاوت(dose-dependent) می‌باشد که کاهش چشمگیری نسبت به نمونه‌های تیمار نشده(نمونه صفر) نداشته است.

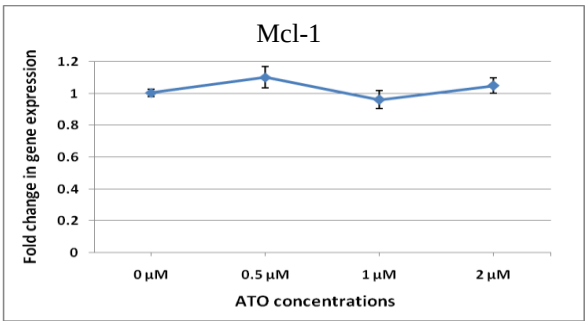


نمودار ۴ : نمودار بیان نسبی ژن کاسپاز ۳ در سلول‌های NB4 تیمار شده با دوز ۲ µM آرسنیک در زمان‌های مختلف که نمایانگر عدم تغییر بیان این ژن می‌باشد.

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

تغییرات در بیان ژن Mcl-1:

از آنجایی که تاکنون اکثر مطالعه‌هایی که روی کاهش Mcl-1 ضمن آپوپتوز صورت گرفته، سطح پروتئین را بررسی کرده است و هنوز مشخص نشده که کاهش پروتئین Mcl-1 به علت کاهش سطح mRNA از طریق رونویسی یا به دلیل کاهش سطح پروتئین و سرکوبی ترجمه می‌باشد، در این تحقیق برای اولین بار، تغییرات Mcl-1 در سطح بیان ژن توسط روش Real-time در سلول‌های APL بررسی شد. همان طور که از منحنی فوق بر می‌آید، بیان ژن Mcl-1 پس از مصرف دارو تفاوت چندانی با نمونه کنترل که تیمار نشده ندارد(نمودار ۵).



نمودار ۵: نمودار بیان نسبی ژن Mcl-1 در سلول‌های NB4 بر اثر تیمار دارویی در زمان ۴۸ ساعت به صورت dose -dependent می‌باشد که تغییر چشمگیری نسبت به نمونه‌های تیمار نشده(نمونه صفر) نداشته است.

بحث

در این پروژه تحقیقاتی، نشان داده شد که در اثر تیمار سلول‌های NB4 با آرسنیک تری‌اکسید، بیان ژن Bcl-2 هم به صورت وابسته به دوز و هم به صورت وابسته به زمان به شدت کاهش می‌یابد. بنابراین یکی از مکانیسم‌های مهم عمل داروی آرسنیک تری‌اکسید، به راه انداختن مسیر میتوکندریایی آپوپتوز می‌باشد. با این حال مشاهده گردید که الگوی بیانی ژن‌های کاسپاز ۳ و Mcl-1 پس از درمان سلول‌های سرطانی با دارو، تغییر قابل ملاحظه‌ای نمی‌کند.

از زمان اولین مشاهده رابطه آرسنیک و سرطان پوست در دهه ۱۸۲۰، ترکیبات آرسنیکی عموماً به عنوان کارسینوژن‌های بالقوه محیطی و هم زمان به عنوان موتاژن برای پوست و ریه پذیرفته شدند(۱۶، ۱۵). با این وجود غلظت مناسب بعضی ترکیبات آرسنیک(آرسنیک تری‌اکسید)، فوایدی از جمله تحریک هماتوپوئز برای فیزیولوژی بدن انسان را دارد. استفاده از ترکیبات آرسنیک به عنوان دارو، قدیمی‌ترین تاریخچه را در طب سنتی چین دارد(۱۸، ۱۷). آرسنیک تری‌اکسید یک ترکیب غیر آلی ۳ ظرفیتی است که به خوبی ثابت شده برای درمان بیماران APL مفید است(۱۹). APL ممکن است اولین لوکمیای حاد باشد که با توسعه راه‌کارهای درمانی و دارویی، تا اندازه زیادی قابل درمان می‌باشد(۲۰).

فیوژن PML-RARα در سلول‌های APL ، با فاکتورهای رونویسی تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها بر همکنش می‌کند و تأثیرات Post-Transcriptional خود را می‌گذارد(۲۱). در این تحقیق نشان داده شد که داروی ATO قادر است این مهار رونویسی را برگردانده و بیان ژن‌ها را در سلول سرطانی تغییر دهد. از این جا می‌توان نتیجه گرفت که ATO ، فیوژن PML-RARα را هدف می‌گیرد و روی فاکتورهای رونویسی تنظیم‌کننده تأثیر می‌گذارد. به رغم تمامی پژوهش‌های انجام شده در مورد ویژگی‌های ضد سرطانی آرسنیک تری‌اکسید، مکانیسم‌های دقیق مولکولی این داروی قدیمی هنوز کاملاً شناسایی نشده است. به همین منظور در این پروژه تلاش شد تا مکانیسم القای آپوپتوز آن مورد بررسی قرار گیرد.

در سال ۲۰۰۲، لی و همکارانش دریافتند که ATO باعث فسفواستیلاسیون هستیون H_3 در کروماتین، در لوکوس کاسپاز ۱۰ می‌شود. این پدیده باعث بیان و فعال شدن کاسپاز ۱۰ در سلول‌های APL و متعاقباً فعال‌سازی کاسپازهای ۳ و ۸ می‌شود که به آپوپتوز می‌انجامد(۲۲). در سال ۲۰۰۱ ، جانگ ووک و همکارانش گزارش کردند که ATO ، اثرات مهار رشدش را با تغییر در بیان یا فعال سازی چندین پروتئین کلیدی تنظیم کننده G_2/M اعمال می‌کند. آرسنیک باعث افزایش $CyclinB_1$ ، فعال‌سازی $cdc_2/cyclin$ B_1 kinase و فسفریلاسیون Bcl-2 می‌شود که با فعال‌شدن کاسپازهای ۳ و۷ در سلول‌های میتوزی همراه است. این پژوهشگران نتیجه گرفتند که یک مکانیسم القای آپوپتوز توسط آرسنیک ممکن است در نتیجه توقف Cell Cycle باشد(۲۳). این گزارش‌ها و سایر پژوهش‌های انجام شده

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

حاکی از فعال شدن کاسپاز۳ در اثر ATO می‌باشند که همگی روی پروتئین این ژن مطالعه کرده‌اند(۲۴، ۱۶). در پژوهش حاضر، بیان کاسپاز ۳ در سطح ژن بررسی گردید و مشاهده شد که ATO اثری روی بیان ژن کاسپاز ۳ ندارد. از آن جایی که کاسپاز ۳ از عناصر ضروری انجام آپوپتوز است، می‌توان نتیجه گرفت که ATO در یک سطح پس از ترجمه‌ای، روی کاسپازها اثر می‌گذارد و چنین تنظیم پس از ترجمه‌ای، تضمین کننده این است که کاسپازها بتوانند در صورت لزوم به سرعت فعال شوند و آپوپتوز را به راه اندازند.

نقش پروتئین Mcl-1 در پیشبرد آپوپتوز توسط ATO در سلول‌های سرطانی APL هنوز مشخص نیست. Mcl-1 نیز همانند سایر اعضای خانواده Bcl-2 از طریق برهمکنش با پروتئین‌های دیگر، آپوپتوز را مهار می‌کند(۲۵). در این تحقیق، تغییری در بیان ژن Mcl-1 ضمن القای آپوپتوز مشاهده نگردید. یک علت آن می‌تواند این باشد که پروتئین‌های خانواده Bcl-2 ، علاوه بر تنظیم در مرحله نسخه برداری، در مراحل پس از آن نیز تحت کنترل هستند. در پروتئین Mcl-1 ، چند اسید آمینه بین دومین‌های BH3 و BH4 ، هدف‌های تغییرات پس از ترجمه‌ای و یوبی کوئیتینه‌شدن می‌باشند. این تغییرات پس از ترجمه‌ای، پایداری Mcl-1 را تعیین می‌کنند(۲۶).

نیج‌هاوان و همکارانش در سال ۲۰۰۳ ، گزارش کردند که Mcl-1 یک سنسور مهم در مهار سنتز پروتئین است و کاهش پروتئین آن برای القای آپوپتوز ضروری می‌باشد. آن‌ها دریافتند که حذف Mcl-1 طی القای آپوپتوز توسط UV ، به علت نقصان در سنتز پروتئین آن است نه کاهش بیان ژن آن (۲۴). در همین سال ایگلسیاس ـ سرت و همکارانش نشان دادند که پروتئین Mcl-1 به سرعت پس از تیمار سلول‌های Jurkat ، با دو محرک معمول آپوپتوز(آسپیرین و استراسپورین) تحلیل می‌یابد و برعکس، Bcl-2 طی فرآیند مرگ سلولی عملاً ثابت می‌ماند(۲۷). در حالی که در این تحقیق مشاهده گردید که بیان ژن Mcl-1 تغییری نمی‌کند و Bcl-2 شدیداً کاهش می‌یابد. دلیل چنین تفاوتی می‌تواند متفاوت بودن الگوهای مرگ سلولی در سلول‌های مختلف با داروهای متفاوت باشد.

پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک با نیمه عمر کوتاه مثل Mcl-1 ، واسطه‌های مهم آپوپتوز هستند زیرا انتظار می‌رود به سرعت توسط مهار ترجمه‌ای کاهش یابند(۲۸). این نتایج ضمن تایید حفظ سطح Mcl-1 mRNA طی آپوپتوز، به اهمیت کنترل ترجمه‌ای این پروتئین اشاره می‌کند و نشان می‌دهد که مهار در سطح رونویسی، یک رخداد عمومی در آپوپتوز نیست. در واقع ضمن آپوپتوز، تغییرات همیشه در سطح بیان ژن رخ نمی‌دهد و می‌تواند در سطح ترجمه‌ای باشد.

فعال شدن مسیر سیگنالینگ NF-kB توسط ATRA و در نتیجه مهار فعال سازی JNK که در بردارنده سیگنال مرگ است، برای تمایز گرانولوسیت‌ها ضروری نیست و باعث تجمع سلول‌های نابالغ APL و توسعه سندرم ATRA می‌شود(۲۹). ماتیو و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که آرسنیک می‌تواند بر این اثر ضد آپوپتوزی غلبه کند و در کاهش اثرات جانبی مربوط به تجمع سلول‌های بالغ مفید واقع شود. ATO در تجزیه مهار کننده NF-kB (I-kB) توسط ATRA به عنوان آنتاگونیسم عمل می‌کند و متعاقباً باعث کاهش فعال‌سازی NF-kB و کاهش بیان ژن‌های فرودست این فاکتور رونویسی می‌شود(۳۰). هم چنین اخیراً مطالعه مومنی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داده که ATO از طریق مهار NF-kB ، باعث مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز می‌شود(۱۴).

در سلول‌های سرطانی، ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک بیان می‌شوند و سطح بیان آن‌ها با پیشرفت بیماری بالا می‌رود. هم چنین در این سلول‌ها، فاکتورهای NF-kB ، c-myb و STAT5 به طور پیوسته فعالیت دارند که می‌توانند رونویسی مهارکننده‌های آپوپتوزی Bcl-2 و CIAP2 را تحریک کنند (۳۲، ۳۱). بنابراین فعالیت دایمی NF-kB ، سلول‌ها را از آپوپتوز محافظت می‌کند و به سمت سرطانی شدن سوق می‌دهد و عواملی که فعالیت NF-kB یا بیان Bcl-2 را سرکوب می‌کنند، کاندیدهای خوبی برای درمان هستند چون قادر به القای آپوپتوز می‌باشند.

تون کی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با روش الایزا نشان دادند که پس از تیمار سلول‌های تومور موکوزیس فونگوئید با دوز ۱ μM آرسنیک تری‌اکسید، فعالیت binding فاکتورهای رونویسی NF-kB و STAT5 به توالی

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

اتصالیشان در DNA به شدت کاهش یافت(۲۸). NF-kB ، فاکتور رونویسی سلول‌های یوکایوتی است که به توالی دکامریک مخصوصی (GGG ACT TTC C) بر روی DNA باند می‌شود(۳۳). به خصوص STAT ها برای تنظیم ژن‌های Bcl-2 و BCL-XL بسیار مهم هستند زیرا یک مکان اتصالی برای STAT5 در ناحیه تنظیمی ژنBcl-2 شناسایی شده است(۳۴).

از آن جا که ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 از ژن‌های مهم فرودست فاکتورهای رونویسی NF-kB و STAT5 است، نتایج پژوهش ما به خوبی با نتایج این محققین هم‌خوانی دارد و در واقع مهم‌ترین علت کاهش بیان ژن Bcl-2 در آپوپتوز القا شده توسط ATO ، کاهش اتصال NF-kB و STAT5 به پروموتر این ژن در اثر آرسنیک و مهار نسخه‌برداری و بیان ژن Bcl-2 می‌باشد.

نتیجه‌گیری

همان گونه که از مجموع این گزارش‌ها و پژوهش‌های انجام شده و هم چنین نتایج تحقیق حاضر برمی‌آید، آرسنیک تری‌اکسید مکانیسم‌های عمل متعددی دارد و از مسیرهای گوناگون عمل می‌کند. مسیری که در این مطالعه بررسی شد، مسیر میتوکندریایی القای آپوپتوز بود که مشاهده شد آرسنیک با ممانعت از بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک، باعث به راه انداختن آپوپتوز می‌شود.

از آن جا که وقوع آپوپتوز مستلزم فعال شدن کاسپاز ۳ و کاهش Mcl-1 می‌باشد و در این مطالعه با استفاده از روش Real-time PCR تغییری در بیان آن‌ها مشاهده نگردید؛ می‌توان نتیجه گرفت که روش Real-time به تنهایی برای بررسی این ژن‌ها طی آپوپتوز کافی نیست و پیشنهاد می‌شود در پروژه‌های بعدی، علاوه بر Real-time ، با روش وسترن بلات نیز تغییرات پروتئین آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. در ایران و در برخی کشورهای دیگر، ATO به عنوان درمان اولیه در بیماران APL (newly diagnosed) استفاده می‌شود با این وجود میزان کارآیی و تأثیر آن روی بیماران APL که پیش از آن هیچ درمانی دریافت نکرده‌اند، نامشخص است(۳۶، ۳۵، ۱۲). از این رو تحقیقات آتی درباره مکانیسم‌های دقیق این دارو که توسط آن در چرخه سلولی و رونویسی ایفای نقش می‌کند، می‌تواند ما را در بهینه کردن اثرات درمانی و در عین حال کاستن از توکسیسیتی و اثرات جانبی آن یاری کند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت‌های مالی و تجهیزاتی مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی تهران انجام شده است که بدین وسیله از کلیه مسؤولین و پرسنل صمیمی آن مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

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

References :

1- Lo Coco F, Ammatuna E, Sanz MA. Current treatment of acute promyelocytic leukemia. Haematologica 2007; 92(3): 289-91.
2- Randolph TR. Acute promyelocytic leukemia (AML-M3)--Part 1: Pathophysiology, clinical diagnosis, and differentiation therapy. Clin Lab Sci 2000; 13(2): 98-105.
3- de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. Nature 1990; 347(6293): 558-61.
4- Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. Cell 2002; 108(2): 165-70.
5- Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006: 156-61.
6- Ziaei JE. High frequency of acute promyelocytic leukemia in northwest Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5(2): 188-9.
7- Mele A, Stazi MA, Pulsoni A, Visani G, Monarca B, Castelli G, *et al*. Epidemiology of acute promyelocytic leukemia. Haematologica 1995; 80(5): 405-8.
8- Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 51(1): 1-28.
9- Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, *et al*. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. N Engl J Med 1998; 339(19): 1341-8.
10- Tallman MS. Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 2007; 20(1): 57-65.
11- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008; 111(5): 2505-15.
12- Mathews V, George B, Lakshmi KM, Viswabandya A, Bajel A, Balasubramanian P, *et al*. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. Blood 2006; 107(7): 2627-32.
13- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, *et al*. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. Blood 1997; 89(9): 3354-60.
14- Momeny M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Dehpour AR, Rahimi Balaei M, Abdolazimi Y, *et al*. Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B-mediated inhibition of p73 transcription and prevention of NF-kappaB-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-X(L) and survivin. Med Oncol 2009. [Epub ahead of print]
15- Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. Nat Rev Cancer 2002; 2(9): 705-13.
16- Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. Cancer Invest 2004 ; 22 (3) : 389-400.
17- Diaz Z, Colombo M, Mann KK, Su H, Smith KN, Bohle DS, *et al*. Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines. Blood 2005; 105(3): 1237-45.
18- Ho SY, Chen WC, Chiu HW, Lai CS, Guo HR, Wang YJ. Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances apoptotic effects in U937 cells through increased mitotic arrest and ROS generation. Chem Biol Interact 2009; 179(2-3): 304-13.
19- Tallman MS. The expanding role of arsenic in acute promyelocytic leukemia. Semin Hematol 2008; 45(3 Suppl 2): S25-9.
20- Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Wierda W, Faderl S, Garcia-Manero G, *et al*. Therapeutic advances in leukemia and myelodysplastic syndrome over the past 40 years. Cancer 2008; 113(7 Suppl): 1933-52.
21- Slack JL, Waxman S, Tricot G, Tallman MS, Bloomfield CD. Advances in the management of acute promyelocytic leukemia and other hematologic malignancies with arsenic trioxide. Oncologist 2002; 7 Suppl 1: 1-13.
22- Li J, Chen P, Sinogeeva N, Gorospe M, Wersto RP, Chrest FJ, *et al*. Arsenic trioxide promotes histone H3 phosphoacetylation at the chromatin of CASPASE-10 in acute promyelocytic leukemia cells. J Biol Chem 2002; 277(51): 49504-10.
23- Park JW, Choi YJ, Jang MA, Baek SH, Lim JH, Passaniti T, *et al*. Arsenic trioxide induces G2/M growth arrest and apoptosis after caspase-3 activation and bcl-2 phosphorylation in promonocytic U937 cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 286(4): 726-34.
24- Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S. The molecular mechanism of arsenic trioxide-induced apoptosis and oncosis in leukemia/lymphoma cell lines. Acta Haematol 2003; 110(1): 1-10.
25- Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. Clin Cancer Res 2007; 13(24): 7254-63.
26- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, *et al*. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. Genes Dev 2003; 17(12): 1475-86.
27- Iglesias-Serret D, Piqué M, Gil J, Pons G, López JM. Transcriptional and translational control of Mcl-1 during apoptosis. Arch Biochem Biophys 2003; 417(2): 141-52.
28- Tóthová E, Fricova M, Stecová N, Kafková A, Elbertová A. High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. Neoplasma 2002; 49(3): 141-4.
29- Mathieu J, Giraudier S, Lanotte M, Besançon F. Retinoid-induced activation of NF-kappaB in APL cells is not essential for granulocytic differentiation, but prolongs the life span of mature cells. Oncogene 2005; 24(48): 7145-55.
30- Tun-Kyi A, Qin JZ, Oberholzer PA, Navarini AA, Hassel JC, Dummer R, *et al*. Arsenic trioxide down-regulates antiapoptotic genes and induces cell death in mycosis fungoides tumors in a mouse model. Ann

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

Oncol 2008; 19 (8): 1488-94.
31- Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(19): 10057-62.
32- Mathieu J, Besançon F. Arsenic trioxide represses NF-kappaB activation and increases apoptosis in ATRA-treated APL cells. Ann N Y Acad Sci 2006; 1090: 203-8.
33- Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, Ludwig W, Gouilleux-Gruart V, Mertelsmann R, *et al*. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. Blood 1996; 88(3): 809-16.
34- Michel L, Dupuy A, Jean-Louis F, Sors A, Poupon J, Viguier M, *et al*. Arsenic trioxide induces apoptosis of cutaneous T cell lymphoma cells: evidence for a partially caspase-independent pathway and potentiation by ascorbic acid (vitamin C). J Invest Dermatol 2003; 121(4): 881-93.
35- Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Ghaffari SH, Rostami S, Jahani M, Hosseini R, *et al*. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide without ATRA and/or chemotherapy. Ann Oncol 2006; 17(1): 131-4.
36- Miguel AS. Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. Hematology 2006; (1): 147-155.

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

Original Article

The effect of arsenic trioxide treatment on mitochondrial apoptotic gene expression in acute promyelocytic leukemia cell line

Sharifizadeh M.[1], Hashemi M.[2], Momeny M.[3], Alimoghaddam K.[3], Ghavamzadeh A.[3], Ghaffari H.[3]

[1]Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2]Islamic Azad University, Tehran Medical Branch,Tehran, Iran
[3]Hematology , Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute promyelocytic leukemia (APL) is one of the most malignant forms of acute leukemia with a fatal course of only weeks which represents 10-15% of AML in adults. Arsenic trioxide as a single agent factor (without chemotherapy) is the treatment of choice for APL patients; it induces cell death through apoptosis but the mechanism by which arsenic targets apoptosis and dramatically affects gene expression remains poorly understood. Since arsenic is used as first line treatment in Iran, it is worth investigating its effect on expression of genes involved in APL.

Materials and Methods

In this descriptive study, to understand the underlying mechanisms of cell death induction by arsenic, we treated NB4 cell line in a dose and time dependent manner. Extracting RNA and synthesis of cDNA, gene expression of apoptotic genes in mitochondrial pathway including caspase3, Mcl-1 and Bcl-2 was analyzed through Real-Time PCR.

Results

Our findings showed that As_2O_3-induced cell death was paralleled by reduced expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 but the expression of Caspase3 and Mcl-1 did not change after arsenic treatment.

Conclusions

These results suggest that changes in Bcl-2 gene expression may be one of the mechanisms of action of arsenic in induction of apoptosis, while Caspase3 and Mcl-1 gene expression are not affected by arsenic at the transcriptional level.

Key words: Promyelocytic Leukemia, Acute, arsenic trioxide, Apoptosis, Caspase 3, bcl-2 Genes
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(3): 138-147

Received: 7 Feb 2010
Accepted: 14 Jul 2010

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

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