خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۴ زمستان ۹۱ (۳۷۱-۳۶۳)

مقاله پژوهشی

القای آپوپتوز در رده سلولی HL-60 توسط آرسنیک تری‌اکساید با کاهش نسبت بیان Bcl-2 به Bax در سطح mRNA

شهربانو رستمی[۱]، سعید آبرون[۲]، کامران علی مقدم[۳]، مهرداد نوروزنیا[۴]، بهرام چهاردولی[۵]، اردشیر قوام‌زاده[۳]

چکیده

سابقه و هدف

اثرات ضد سرطانی آرسنیک تری‌اکساید(As_2O_3) روی طیف گسترده‌ای از سرطان‌های مختلف نشان داده شده است. بیشترین کارآیی درمانی آرسنیک، در بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می‌باشد. آرسنیک عمدتاً با راه انداختن آپوپتوز در سلول‌های سرطانی عمل می‌کند. در مطالعه حاضر به منظور درک بهتر مکانیسم مولکولی القای آپوپتوز توسط As_2O_3، تاثیر آرسنیک تری اکساید بر روی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2، تنظیم‌کننده‌های اصلی آپوپتوز و p53 بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، آزمایش رنگ سنجی MTT برای بررسی اثر As_2O_3 بر روی مهار رشد سلول‌های HL-60 استفاده شد. میزان mRNA ژن‌های Bax ، Bcl-2 و p53 به روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. از آزمایش آماری t-student، ANOVA و نرم‌افزار SPSS ۱۸ برای تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد.

یافته‌ها

As_2O_3 در طی ۲۴ ساعت به صورت وابسته به دوز، رشد سلول‌های HL-60 را مهار می‌کند. از غلظت ۴ µM ، کاهش معناداری(۳٪ ± ۸۹٪) در بقای سلولی مشاهده شد و مقدار IC50 حدود ۱۶ µM به دست آمد. هیچ بیانی از ژن P53 در سلول HL-60 شناسایی نشد. نتایج Real-time PCR نشان داد در حالی که میزان بیان Bax mRNA در سلول‌های HL-60 تیمار شده به صورت معناداری تغییر نکرد، نسبت Bcl-2/Bax به صورت معنادار و وابسته به دوز کاهش یافت.

نتیجه گیری

As_2O_3 بخشی از فعالیت ضد توموری خود را با القای آپوپتوز و از طریق کاهش نسبت Bcl-2/Bax در رده سلولی HL-60 ، فاقد بیان ژن P53 ، اعمال می‌کند. برای تایید این نتایج بررسی بیشتر در سطح پروتئین لازم است.

کلمات کلیدی: آرسنیک تری‌اکساید، پروتئین Bax ، ژن‌ها، bcl-2

تاریخ دریافت : ۹۰/۱۲/ ۲
تاریخ پذیرش : ۹۱/۲/۱۲

۱- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۵۵
۳ـ فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۴- PhD ژنتیک پزشکی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۵- دانشجوی PhD هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

مقدمه

قرار گرفتن مزمن در معرض ترکیبات حاوی آرسنیک از طریق آلودگی آب آشامیدنی، پزشکی و یا قرار گرفتن در معرض حرفه‌ای، با افزایش خطر ابتلا به انواع سرطان‌ها از جمله پوست، ریه، کلیه، مثانه، کبد و سیستم خونساز در ارتباط است(۱). جالب توجه است که ترکیبات حاوی آرسنیک، برای صدها سال در درمان سرطان، هم در کشورهای غربی و هم در طب سنتی چینی استفاده می‌شدند(۲، ۱). در سال‌های اخیر با توجه به نتایج چشمگیری که از درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد(APL) عود کرده، مقاوم به درمان و تازه تشخیص داده شده توسط آرسنیک تری‌اکساید(As_2O_3) گزارش شده، استفاده از این دارو مجدداً مورد توجه قرار گرفته است(۵-۳). مکانیسم‌های مختلفی برای توضیح علت حساسیت بالای سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتی حاد در محیط‌های آزمایشگاهی و موجودات زنده بیان شده است. از جمله گزارش شده وجود ژن الحاقی PML/RARA در بیماران APL و همین طور در رده سلولی NB4 که دارای این جابه‌جایی کروموزومی است، یکی از علل این افزایش حساسیت می‌باشد(۶). همین طور ارتباط معکوسی بین میزان گلوتاتیون(GSH) سلولی و حساسیت به آرسنیک وجود دارد به طوری که میزان بالای GSH در سلول HL-60 نسبت به NB-4 ، به عنوان علت حساسیت کمتر این سلول‌ها به آرسنیک بیان شده است(۷). در محیط‌های آزمایشگاهی و موجودات زنده، مطالعه‌های زیادی برای بررسی تاثیر این دارو بر روی سایر بدخیمی‌های خونی و حتی تومورهای جامد انجام شده است. آرسنیک قادر به القای انواع مرگ سلولی از جمله آپوپتوز، نکروز و اتوفاژی در این بدخیمی‌ها بوده است اگر چه غلظت‌هایی به مراتب بالاتر از دوز قابل تحمل از نظر بالینی، در مواردی غیر از APL لازم است(۸، ۲، ۱). گونه‌های فعال اکسیژن(ROS) که به واسطه As_2O_3 تولید می‌شوند، منجر به فعال شدن مسیرهای پروآپوپتوزی در انواع سلول‌های توموری می‌گردند(۱). در سلول‌های سرطان سرویکس، آرسنیک با القای افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، باعث فعال شدن p38 MAPK و JNK می‌شود که نتیجه آن فعال شدن Bax و فسفریله شدن Bcl-2 و در نهایت القای آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی می‌باشد(۹). همین طور در مطالعه‌های مختلف نشان داده شده As_2O_3 می‌تواند به صورت اختصاصی، سلول‌هایی که دارای ناهنجاری‌های مولکولی خاصی هستند را هدف قرار دهد. از جمله As_2O_3 با تجزیه پروتئین الحاقی AML1/MDS1/EVI1 که در اثر جابه‌جایی کروموزومی t(3;21)(q26;q22) ایجاد می‌شود، به صورت اختصاصی سلول‌های بیان‌کننده این پروتئین الحاقی را هدف قرار می‌دهد(۱۰). همین طور As_2O_3 باعث القای یوبی‌کوئیتینه شدن و تجزیه پروتئازومی BCR/ABL می‌شود(۱۱).

علی‌رغم مطالعه‌های وسیعی که در سال‌های اخیر بر روی مکانیسم عملکرد As_2O_3 انجام شده، هنوز مکانیسم دقیق عملکرد ضد توموری آن به خوبی مشخص نشده است. هدف از این مطالعه، بررسی سلولی و مولکولی مکانیسم‌های درگیر در فعالیت ضد توموری As_2O_3 بر علیه رده سلولی HL-60 بود. به این منظور تغییرات بیان دو ژن اصلی درگیر در آپوپتوز یعنی Bcl-2 و Bax و همین طور میزان بیان ژن p53 مورد بررسی قرار گرفت. رده سلولی HL-60 انتخاب شد زیرا اگر چه این رده سلولی به عنوان یک رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتی حاد معرفی می‌شود ولی فاقد جابه‌جایی کروموزومی t(15;17) و محصول حاصل از آن یعنی ژن الحاقی PML/RARA می‌باشد. از طرفی برخلاف رده سلولی NB4 که یک رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتی حاد دارای ژن الحاقی PML/RARA و همین طور دارای بیان ژن P53 می‌باشد، HL-60 فاقد بیان ژن P53 است(۱۲).

مواد و روش‌ها

بررسی اثر As_2O_3 بر روی رشد سلول‌های HL-60 به روش MTT:

در این مطالعه تجربی، رقت‌های مختلف از آمپول As_2O_3 (سینا دارو) در محیط کشت RPMI فاقد FBS تهیه شد. سلول‌های HL-60 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ ºC و ۵٪ گاز CO_2 کشت داده شدند. به منظور بررسی تاثیرات سایتوتوکسیک دارو به

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

روش MTT ، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰^{۳} از سلول‌هایی که در فاز تصاعدی رشد بودند، به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، به هر چاهک از رقت‌های ۳۲-۱ µM از داروی تهیه شده اضافه گردید(هر رقت به صورت سه تایی به کار می‌رود).

چاهکی که تنها حاوی محیط کشت فاقد سلول بود به عنوان بلانک دستگاه الایزا ریدر استفاده شد، پلیت‌های آماده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ ºC و فشار ۵٪ CO_2 قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها سانتریفوژ شدند و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT افزوده و پس از تکان دادن، پلیت به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. سپس پلیت سانتریفوژ شد و پس از دور ریختن مایع رویی، به رسوب ته پلیت ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید. در نهایت جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. به منظور برآورد درصد سلول‌های زنده، از فرمول زیر استفاده شد و کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید:

درصد سلول‌های زنده نسبت به سلول کنترل =

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری چاهک‌های حاوی سلول‌های تحت تیمار با دارو}}{\text{میانگین جذب نوری چاهک‌های حاوی سلول‌های بدون تیمار دارویی}} \times ۱۰۰$$

استخراج RNA ، تیمار با DNase و ساخت cDNA:

سلول‌ها با غلظت‌های ۵ ، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومول از دارو در فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتری کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها سانتریفوژ و برای استخراج RNA به کار برده شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت QIAzol (کیاژن) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA استخراج شده جهت حذف هرگونه آلودگی DNA که می‌تواند در مرحله Real-time PCR ایجاد اختلال کند، تحت تیمار آنزیمی DNase (فرمنتاز) قرار گرفت. در نهایت RNA از نظر کمی و کیفی ارزیابی شده و ۱ µg از RNA برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای ساخت cDNA ، کیت ساخت cDNA و آغازگر OligodT (فرمنتاز)، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به کار برده شد.

Real-time PCR:

در این طرح از دستگاه Step One Plus (بیوسیستم) و روش SYBR Green برای تعیین کمی میزان بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد. هم زمان ژن خانه پای HPRT (هایپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز) برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از نرم‌افزار AlleleID برای طراحی آغازگرها استفاده شد (جدول ۱).

قبل از انجام Real-time PCR بر روی نمونه‌ها، منحنی استاندارد برای ژن‌های Bax ، Bcl-2 و HPRT با استفاده از سریال رقتی که از نمونه cDNA سلول HL-60 تیمار نشده به دست آمده بود رسم شد.

چرخه دمایی شامل یک مرحله ۹۵ ºC به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال‌سازی آنزیم Hot start و متعاقب آن ۴۵ چرخه دمایی شامل ۹۵ ºC به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ ºC به مدت ۱ دقیقه انجام شد. واکنش‌های PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و با ۴ µL از غلظت ۱۰ µM آغازگرها و ۱۰ µL میکس(۲ X) و ۵ µL از cDNA ساخته شده از هر نمونه انجام شد.

در انتهای سیکل‌های تکثیری، منحنی دمای ذوب برای اطمینان از اختصاصی بودن و عدم وجود محصول غیر اختصاصی رسم شد. از روش ΔΔct برای بررسی تغییرات نسبی میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 استفاده شد(۱۳). همه واکنش‌ها به صورت دوتایی و دو بار به صورت مستقل تکرار شد.

جدول ۱: توالی آغازگرها و طول قطعه تکثیر شده

آغازگر	سکانس	سایز (bp)
HPRT (F)	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	۱۱۰
HPRT (R)	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	
Bcl-2 (F)	GGGGAGGATTGTGGCCTTC	۹۰
Bcl-2 (R)	CAGGGCGATGTTGTCCACC	
Bax-F	GATGCGTCCACCAAGAAGC	۱۶۵
Bax-R	CCAGTTGAAGTTGCCGTCAG	
P53 (F)	AGACCTATGGAAACTACTTC	۷۶
P53 (R)	GGACAGCATCAAATCATC	

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

تجزیه و تحلیل آماری:

نرم‌افزار SPSS۱۸ و Excel برای تجزیه و تحلیل نتایج و رسم نمودارها به کار برده شد. جهت مقایسه اثر غلظت‌های مختلف As_2O_3 بر روی سلول‌ها از نظر بازدارندگی رشد و تغییر در میزان بیان ژن‌ها نسبت به سلول‌های تیمار شده با محیط بدون As_2O_3 ، از آزمون آماری t و ANOVA استفاده شد. $p< ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

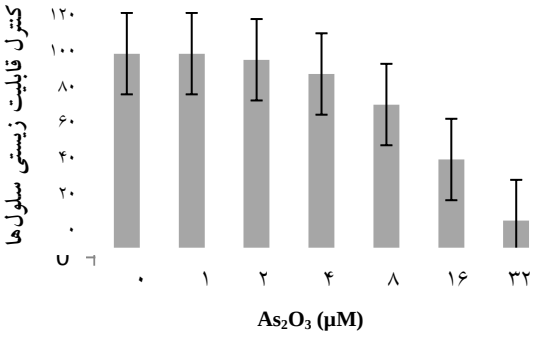
اثر مهارکننده رشد آرسنیک تری اکساید بر روی سلول‌های HL-60 :

اثر مهار رشد As_2O_3 بر روی سلول‌های HL-60 با استفاده از روش MTT بررسی شد. جذب نوری ثبت شده چاهک‌هایی که سلول‌ها در آن با غلظت‌های مختلف دارو تیمار شده بودند، با جذب نوری چاهک‌های کنترل (سلول‌ها هیچ تیمار دارویی دریافت نکرده بودند) مقایسه شد و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید(نمودار ۱).

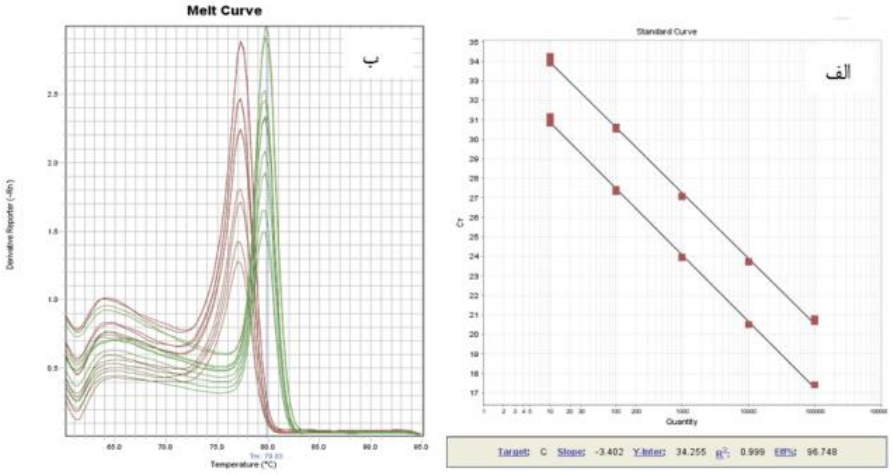
همان طوری که در نمودار ۱ نشان داده شده، As_2O_3 از غلظت ۴ µL ، به مقدار معناداری باعث کاهش قابلیت زیستی سلول‌ها شد($p< ۰/۰۵$). این کاهش قابلیت زیستی در ۲۴ ساعت، به صورت وابسته به دوز بود. غلظت مورد نیاز از دارو برای مهار رشد ۵۰ درصدی در سلول‌های HL-60 در حدود ۱۶ µL به دست آمد.

بررسی بیان p53 و تاثیرغلظت‌های مختلف As_2O_3 بر روی میزان بیان Bax و Bcl-2 :

منحنی استانداردی که از تکثیر غلظت‌های مختلف HL-60 با استفاده از آغازگرهای Bax و HPRT رسم شده، نشان‌دهنده شیب منحنی تقریباً یکسان و در حدود ۳/۴ و کارایی PCR در حدود ۹۷ درصد برای هر دو ژن بود، نتیجه مشابهی با استفاده از آغازگرهای Bcl-2 نیز به دست آمد. منحنی ذوب، نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر با استفاده از آغازگرهای استفاده شده در مطالعه بود(شکل ۱).

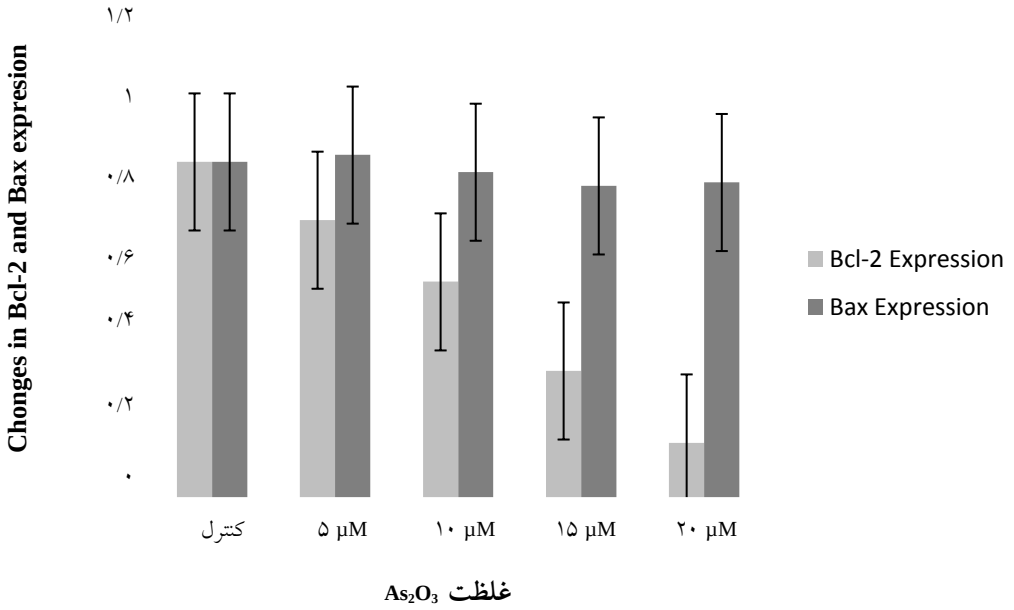


نمودار ۱: تاثیر آرسنیک تری اکساید بر روی بقای رده سلولی HL-60. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های نشان داده شده از دارو قرار گرفتند و بقای سلول‌ها به روش MTT بررسی شد. نتایج به صورت میانگین ±SD سه آزمایش مستقل آورده شده است.

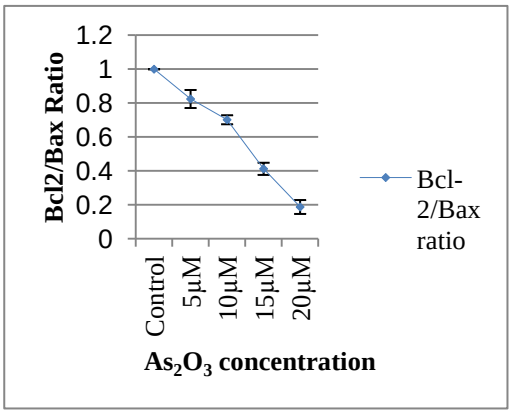


شکل ۱: الف) منحنی استاندارد حاصل از تکثیر رقت‌های ۱ به ۱۰ رده سلولی HL-60 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های هدف Bax و HPRT ، ب) منحنی ذوب محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]



نمودار ۲: تاثیر As_2O_3 بر روی بیان mRNA ژن‌های Bax و Bcl-2 در رده سلولی HL-60 . کاهش بیان mRNA ژن‌های Bax و Bcl-2 پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های نشان داده شده از As_2O_3



غلظت As_2O_3	۵ µM	۱۰ µM	۱۵ µM	۲۰ µM
میانگین درصد نسبت Bcl-2/Bax در مقایسه با کنترل ± SD	۸۲ ± ۵	۷۰ ± ۲/۶	۴۱ ± ۳/۵	۱۹ ± ۴

نمودار ۳: mRNA ژن Bcl-2 به Bax بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف As_2O_3 پس از ۲۴ ساعت

تغییرات بیان mRNA مربوط به ژن Bcl-2 به دنبال تیمار سلول‌ها به غلظت‌های ۵ ، ۱۰ ، ۱۵ و ۲۰ میکرومول از دارو، نسبت به میزان بیان این ژن در سلول‌هایی که هیچ تیمار دارویی نداشتند بررسی شد(نمودار ۲).

چنانچه مشاهده می‌شود، بیان ژن Bcl-2 به صورت وابسته به دوز و به میزان معناداری کاهش یافت($p<$ ۰/۰۵). در همین نمودار تغییرات بیان ژن Bax نیز آورده شده است. در غلظت‌های یکسان، تغییر قابل توجهی در میزان بیان ژن Bax مشاهده نشد. از آن جایی که در واقع نسبت Bcl-2-Bax ، به جای تغییرات هر کدام از این ژن‌ها به تنهایی، تعیین‌کننده سرنوشت سلول در پاسخ به دارو است، به همین دلیل نسبت تغییرات این دو نیز بررسی شد. همان طوری که در نمودار ۳ آورده شده است، نسبت Bcl-2-Bax به صورت وابسته به دوز، کاهش معناداری را نشان می‌دهد($p<$ ۰/۰۵). به دلیل اختلافاتی که در مورد بیان p53 در سلول HL-60 وجود دارد، بیان این ژن نیز در سلول‌ها بررسی شد و هیچ گونه بیانی از mRNA ژن p53 در این رده سلولی شناسایی نشد.

بحث

در این مطالعه تاثیر As_2O_3 بر روی رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتی حاد HL-60 ، فاقد جابه‌جایی کروموزومی t(15;17) ، بررسی شد. نتایج این مطالعه،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

نشان داد As_2O_3 قادر به مهار رشد سلولی در سلول‌های HL-60 است. میزان غلظت مهاری ۵۰ درصد(IC50) به دست آمده در این مطالعه در ۲۴ ساعت حدود ۱۶ µM محاسبه شد. این مقدار خیلی بیشتر از غلظتی از As_2O_3 است که در سطح بالینی کاربرد دارد(۶). رده‌های سلولی لوسمی حساسیت متفاوتی نسبت به آپوپتوز القا شده توسط آرسنیک تری‌اکساید از خود نشان می‌دهند. p53 نقش مهمی در آپوپتوز القا شده توسط انواع داروهای شیمی درمانی دارد و موتاسیون در p53 ، با کاهش تاثیر داروهای شیمی درمانی همراه است(۱۴). به طوری که با انتقال نوع وحشی p53 به سلول‌های سرطانی، حساسیت این سلول‌ها به داروهای شیمی درمانی افزایش یافته است(۱۵). در انواع رده‌های سلولی دارای نوع وحشی ژن p53 ، آرسنیک تری‌اکساید با افزایش دادن میزان بیان p53، باعث القای آپوپتوز می‌شود(۱۶). در مطالعه‌ای که توسط یو و همکارانش بر روی نقش p53 در اثرات درمانی آرسنیک انجام شد، فیبروبلاست‌های جنین موش p53−/− و p53+/+ در غلظت ۲۰-۰ میکرومول به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پاسخ آپوپتوزی متفاوتی بسته به ژنوتیپ p53 مشاهده شد به طوری که القای بیان کاسپاز ۳ در سلول‌های p53−/− و تغییرات بیان ژنی مرتبط با آسیب به DNA و ژن‌های تنظیم‌کننده سیکل سلولی در سلول‌های p53+/+ غالب بود(۱۷). یدجو و همکارانش سلول‌های HL-60 را تا غلظت ۸ µg/mL (معادل ۴۰ میکرومول) و به مدت ۲۴ ساعت تیمار کرده و سپس از نظر آپوپتوز و فعال شدن کاسپاز ۳ بررسی کردند. بر اساس نتایج این مطالعه، متوسط دوز کشنده (LD50) برای این سلول‌ها ۶/۴ µg/mL به دست آمد و درصد سلول‌های کاسپاز ۳ مثبت به صورت وابسته به دوز افزایش نشان داد(۱۸).

هر چند بخش عمده ژن p53 در رده سلولی HL-60 حذف شده و به عنوان یک رده سلولی فاقد بیان p53 مطرح شده است، ولی در مطالعه‌ای که اخیراً توسط کلمنت و همکارانش بر روی تاثیر As_2O_3 در بیان ژن‌های p53 ، c-fos ، RARE، cyclin A و cyclin D1 در رده سلولی HL-60 انجام شد، افزایش بیان p53 در پاسخ به تیمار این سلول‌ها با As_2O_3 گزارش شد(۲۰، ۱۹). به همین دلیل در مطالعه حاضر بیان ژن p53 در سطح mRNA بررسی شد. نتیجه Real-time PCR هماهنگ با اکثر مطالعه‌های انجام شده و بر خلاف مطالعه کلمنت و همکارانش نشان‌دهنده عدم بیان p53 در سلول‌های HL-60 بود.

با هدف تعیین مکانیسم مهار رشدی As_2O_3 در سلول‌های HL-60 ، میزان کمی بیان دو پروتئین مهم درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز Bcl-2 و Bax به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس کمی بررسی شد. آپوپتوز به وسیله تاثیر متقابل تعداد زیادی از ژن‌هایی که مسؤول تحریک یا تنظیم آپوپتوز هستند کنترل می‌شود. اعضای خانواده Bcl-2 ، با تنظیم نفوذپذیری غشا، از تنظیم کننده‌های اصلی این روند هستند(۲۱). این خانواده شامل اعضای آنتی آپوپتوزی Bcl-2 ، Bcl-Xl و اعضای پیش آپوپتوزی مانند Bax و Bad می‌باشند(۲۲). Bax عموماً در سیتوزول جای گرفته، در طی روند آپوپتوز فعال شده و در غشای خارجی میتوکندری، هومودایمریزه و الیگومریزه می‌گردد. کانال‌هایی در غشا تشکیل می‌دهد که باعث ایجاد سوراخ در غشای میتوکندری می‌شود. این کانال‌ها برای پروتئین‌ها و فاکتورهای آپوپتوزی مانند سیتوکروم C که در فضای بین غشایی میتوکندری گیر افتاده‌اند، امکان آزاد شدن به سیتوزول را فراهم می‌کنند. در نتیجه این آزادسازی، آپوپتوز از طریق فعال شدن کاسپازها و آپوپتوزوم‌ها فعال می‌شود(۲۱، ۲۰). Bcl-2 و Bcl-Xl با تشکیل هترودایمر با Bax فعالیت آپوپتوزی آن را سرکوب می‌کنند. گزارش شده نسبت Bax-Bcl-2 در تعیین حساسیت سلول‌ها به تحریکات آپوپتوزی، مهم‌تر از میزان بیان هر کدام از این پروتئین‌ها به تنهایی است. در این مطالعه نیز با این که بیان Bax به میزان معناداری تغییر نداشت ولی اندازه بیان Bcl-2 و نسبت Bcl-2/Bax به اندازه معناداری به دنبال تیمار با As_2O_3 کاهش یافت.

p53 به عنوان تنظیم‌کننده بالادستی ژن Bax عمل می‌کند. این ژن سرکوبگر تومور، به ناحیه پروموتور ژن Bax متصل شده و مستقیماً باعث ترانس اکتیواسیون این ژن پیش آپوپتوزی می‌شود. پروموتور Bax تنها با نوع

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

وحشی و نه موتاسیون یافته p53 ، فعال می‌شود و به همین دلیل بین میزان بیان p53 و بیان Bax می‌تواند ارتباط وجود داشته باشد(۲۳). بنابراین عدم افزایش بیان Bax در این رده سلولی شاید به دلیل همین ارتباط بین بیان Bax و p53 باشد.

بر اساس نتایج این مطالعه، در رده سلولی لوسمی میلوئیدی حاد HL-60 که فاقد بیان ژن P53 است، As_2O_3 حداقل بخشی از فعالیت ضد توموری خود را با القای آپوپتوز و از طریق کاهش نسبت Bcl-2-Bax اعمال می‌کند. مطالعه حاضر بر روی میزان بیان این ژن‌ها در سطح mRNA انجام شده است و مطالعه‌های بیشتری برای بررسی تاثیر دارو بر روی میزان بیان پروتئین‌های مربوطه می‌تواند در تعیین مکانیسم القای آپوپتوز توسط As_2O_3 در رده‌های سلولی فاقد بیان p53 ، کمک‌کننده باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی به خاطر تامین بودجه طرح قدردانی می‌گردد.

References :

1- Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res 2002; 62(14): 3893-903.
2- Evens AM, Tallman MS, Gartenhaus RB. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present and future. Leuk Res 2004; 28(9): 891-900.
3- Lengfelder E, Hofmann WK, Nowak D. Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Leukemia 2012; 26(3): 433-42.
4- Mathews V, Chendamarai E, George B, Viswabandya A, Srivastava A. Treatment of acute promyelocytic leukemia with single-agent arsenic trioxide. Mediterr J Hematol Infect Dis 2011; 3(1): e2011056.
5- Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghaffari SH, Jahani M, Iravani M, *et al*. Phase II Study of Single-Agent Arsenic Trioxide for the Front-Line Therapy of Acute Promyelocytic Leukemia. J Clin Oncol 2011; 29(20): 2753-7.
6- Li L, Wang J, Ye RD, Shi G, Jin H, Tang X, *et al.* PML/RARalpha fusion protein mediates the unique sensitivity to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells: Mechanisms involve the impairment of cAMP signaling and the aberrant regulation of NADPH oxidase. J Cell Physiol 2008; 217(2): 486-93.
7- Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. Blood 1999; 93(1): 268-77.
8- Chiu HW, Ho YS, Wang YJ. Arsenic trioxide induces autophagy and apoptosis in human glioma cells *in vitro* and *in vivo* through downregulation of survivin. J Mol Med (Berl) 2011; 89(9): 927-41.
9- Kang YH, Lee SJ. The role of p38 MAPK and JNK in Arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells. J Cell Physiol 2008; 217(1): 23-33.
10- Shackelford D, Kenific C, Blusztajn A, Waxman S, Ren R. Targeted degradation of the AML1/ MDS1/ EVI1 oncoprotein by arsenic trioxide. Cancer Res 2006; 66(23): 11360-9.
11- Zhang QY, Mao JH, Liu P, Huang QH, Lu J, Xie YY, *et al*. A systems biology understanding of the synergistic effects of arsenic sulfide and Imatinib in BCR/ABL-associated leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(9): 3378-83.
12- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, *et al*. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood 1979; 54(3): 713-33.
13- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. Methods 2001; 25(4): 402-8.
14- Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG. The 653 tumor suppressor: master regulator of diverse cellular process es and therapeutic target in cancer. Biochem Biophys Res Commun 2010; 396(1): 85-9.
15- Wiman KG. Restoration of wild-type p53 function in human tumors: strategies for efficient cancer therapy. Adv Cancer Res 2007; 97: 321-38.
16- Wang Y, Wei Y, Zhang H, Shi Y, Li Y, Li R. Arsenic trioxide induces apoptosis of p53 null osteosarcoma MG63 cells through the inhibition of catalase. Med Oncol 2012; 29(2): 1328-34.
17- Yu X, Robinson JF, Gribble E, Hong SW, Sidhu JS, Faustman EM . Gene expression profiling analysis reveals arsenic-induced cell cycle arrest and apoptosis in p53-proficient and p53-deficient cells through differential gene pathways. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 233(3): 389-403.
18- Yedjou C, Tchounwou P, Jenkins J, McMurray R. Basic mechanisms of arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. J Hematol Oncol 2010; 3: 28.
19- Wolf D, Rotter V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82(3): 790-4.
20- Yedjou CG, Tchounwou PB. Modulation of p53, c-fos, RARE, cyclin A, and cyclin D1 expression in human leukemia (HL-60) cells exposed to arsenic trioxide. Mol Cell Biochem 2009; 331(1-2): 207-14.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

21- Bedner E, Li X, Kunicki J, Darzynkiewicz Z. Translocation of Bax to mitochondria during apoptosis measured by laser scanning cytometry. Cytometry 2000; 41(2): 83-8.
22- Jia L, Patwari Y, Srinivasula SM, Newland AC, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, *et al.* Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. Oncogene 2001; 20(35): 4817-26.
23- Wu X, Deng Y. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. Front Biosci 2002; 7: d151-6.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 9(4): 363-371

Original Article

Arsenic trioxide-induced apoptosis in HL-60 cell line by decreasing the ratio of Bcl-2 to Bax mRNA expression

Rostami SH.[1], Abroun S.[2], Alimoghaddam K.[1], Norouz Nia M.[2], Chahardouli B.[1], Ghavamzadeh A.[1]

[1]Hematology-Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Arsenic trioxide (As_2O_3) has been shown to have anti-cancer effects on a wide range of cancers. As_2O_3 has proved to be the most efficient in treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) patients. It primarily acts by triggering apoptosis in cancer cells. To better understand the molecular mechanisms involved in As_2O_3-induced apoptosis, in the present study we examined the effects of As_2O_3 both on the expression of Bax and Bcl-2 (the major regulators of apoptosis), and p53 genes in HL-60 cell line.

Materials and Methods

In this experimental study, the MTT colorimetric assay was used to assess the growth-inhibitory effect of As_2O_3 on HL-60 cells. The mRNA levels of p53, Bax and Bcl-2 were analyzed by using Real-time PCR. Data were analyzed by using SPSS18, t-test and ANOVA tests.

Results

As_2O_3 inhibits the growth of HL-60 cells in a dose dependent manner at 24h. Significant decrease (89% ± 3%) in cell viability was observed at 4μM and the IC50 value was about 16 μM. In HL-60 cell, no expression of p53 was detected. Real-time PCR results showed while Bax mRNA expression was not significantly affected in As_2O_3 treated HL-60, the Bcl-2/Bax ratio expression level significantly decreased in a dose dependent manner.

Conclusions

As_2O_3 exerts part of its antitumor effect by inducing apoptosis through decreasing Bcl-2/Bax mRNA ratio in p53-null leukemic cell line HL-60. More research on the protein level is required for these results to be reinforced.

Key words: arsenic trioxide, Bax Protein, Genes، bcl-2

Received: 21 Feb 2012
Accepted: 1 May 2012

Correspondence: Abroun S., PhD of Hematology. Assistant Professor of Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14155-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883860; Fax : (+9821) 22301308
E-mail: *abroun@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-19]