خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۳ شماره ۱ بهار ۹۵ (۱۰-۱)

مقاله پژوهشی

القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمیک پرومیلوسیتی(NB4) توسط الیگونوکلئوتید ضد آنزیم تلومراز

لیلا اصغری کیا[۱]، داود بشاش[۲]، سید حمیداله غفاری[۳]، محسن حمیدپور[۴]، اردشیر قوام‌زاده[۵]

چکیده

سابقه و هدف

به دلیل فعالیت بالای آنزیم تلومراز در تکثیر اغلب سرطان‌ها از جمله لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد(APL)، مهار تلومراز روش مناسبی جهت درمان می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثر الیگونوکلئوتید ضد تلومراز بر روی القای مرگ سلولی و آپوپتوز سلول‌های NB4 پرداختیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، به منظور بررسی اثر الیگونوکلئوتید آنتاگونیست تلومراز، سلول‌ها تحت دوزهای مختلف الیگونوکلئوتید قرار گرفتند. جهت بررسی اثر این دارو بر زنده‌مانی سلول‌ها، آزمایش MTT انجام شد و جهت بررسی مولکولی القای آپوپتوز، بیان ژن‌های دخیل در این روند به روش Real-Time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها

الیگونوکلئوتید قادر به کاهش درصد زنده‌مانی و القای مرگ سلولی می‌باشد. تیمار سلول‌ها با الیگونوکلئوتید در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ پیکومولار، به صورت وابسته به دوز پس از طی ۴۸ ساعت باعث کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها و مرگ سلولی گردید. شایان ذکر است میانگین درصد زنده مانی در غلظت ۴۰ پیکومولار، ۶۴٪ بود، در حالی که این درصد در تیمار سلول‌ها با الیگونوکلئوتید کنترل ۹۴٪ می‌باشد. علاوه بر این، نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که مرگ سلولی القا شده با این الیگونوکلئوتید با افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-۲ همراه می‌باشد.

نتیجه گیری

با توجه به طول تلومر کوتاه و فعالیت بالای آنزیم تلومراز در بیماران APL و همچنین اثربخشی الیگونوکلئوتید در القای مرگ سلولی در سلول‌های پرومیلوسیتیک NB4، می‌توان درمان‌های مبتنی بر استراتژی مهار آنزیم تلومراز را به عنوان راه‌کار مناسب در این بیماران مدنظر قرار داد.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آپوپتوز، مرگ سلولی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/ ۶

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون ـ گروه هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۲- PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار گروه هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۳- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ کارگر شمالی ـ تهران ـ ایران ـ کدپستی: ۱۴۱۱۱
۴- PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۵- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، زیر گروهی از لوسمی‌های میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia) است که با جابه‌جایی کروموزومی t (15:17) در ۹۰٪–۸۵٪ موارد همراه بوده و منجر به تشکیل انکوپروتئین PML-RARα می‌شود (۲، ۱). تاکنون پنج ترانسلوکیشن کروموزومی درارتباط با این بیماری شناسایی شده‌اند که همگی با درگیری ژن گیرنده رتینوئیک اسید (متابولیت فعال ویتامین A) یا همان RARα همراه هستند(۳). این بیماری یکی از شدیدترین انواع بیماری AML همراه با خونریزی بوده و در کمتر از چندین هفته می‌تواند سبب مرگ بیماران شود(۳). در بیماران تازه تشخیص‌داده شده، شیمی‌درمانی خط اول دفاعی در این بیماران را تشکیل می‌دهد. با این رژیم درمانی فقط ۴۵٪–۳۵٪ بیماران به بهبودی کامل حدود ۲۵–۱۱ ماه رسیده و خونریزی‌های شدید در بعضی موارد مرگ بیماران را نیز به دنبال دارد. در سال ۱۹۸۵ معرفی ATRA سبب تحولی عظیم در درمان بیماری APL شد. ATRA که ایزومری از ویتامین A می‌باشد، با القای تمایز و پیشبرد مراحل بلوغ باعث افزایش بهبودی کامل به حدود ۸۵٪ می‌شود. با این حال درمان با ATRA در بعضی از بیماران حالت مقاومت دارویی را ایجاد می‌کند که سبب عود بیماری، بالا رفتن تعداد گلبول‌های سفید و ایجاد سندرم کشنده رتینوئیک اسید (RAS) می‌شود(۴).

مشخص شده است که مهم‌ترین تفاوت بین سلول‌های سرطانی و طبیعی، توانایی تکثیر و رشد غیرقابل کنترل، تهاجم به بافت‌ها و انتشار متاستاتیک این سلول‌ها می‌باشد. فعالیت تلومراز و حفظ طول تلومرها، کلید اصلی توانایی سلول‌های سرطانی برای نامیرا شدن می‌باشد(۵). تلومرها توالی‌های تکراری TTAGGG می‌باشند و به عنوان کلاهکی در انتهای DNA ، از کروموزوم سلول‌های یوکاریوتی محافظت می‌کنند. مشخص شده است که از دست رفتن تلومر به بی‌ثباتی ژنتیکی، پیری و آپوپتوز منجر شده و وجود آنزیم تلومراز مانع از کوتاهی و فرسایش تلومرها شده و مسئول نامیرایی سلول‌های تومورال و قابلیت تکثیر نامحدود این سلول‌ها است(۶). این آنزیم در بسیاری از سلول‌های سوماتیک بیان نمی‌شود، اما در سلول‌های سریع‌التکثیر مانند استم سل‌ها (HSC)، سلول‌های جنسی مردان و سلول‌های سرطانی بیان می‌شود(۵). این آنزیم از دو زیر واحد کاتالیتیک تحت عنوان hTERT و یک جزء RNA به نام hTERC تشکیل شده است(۶). با توجه به افزایش فعالیت آنزیم تلومراز در بیش از ۸۵٪ بدخیمی‌های انسان، این آنزیم به عنوان هدف درمانی بسیار امیدوار کننده جهت درمان سرطان‌ها معرفی شده و اخیراً مهارکنندگان تلومراز به عنوان راه‌کارهای درمانی جدید مورد توجه شایانی قرار گرفته‌اند(۷).

از مهم‌ترین داروهای مهارکننده تلومراز می‌توان به ترکیبات الیگونوکلئوتیدی مهارکننده hTERC اشاره‌کرد. ترکیبات الیگونوکلئوتیدی هم چون GRN163L با هدف قراردادن ۱۱ نوکلئوتید واحد RNA تلومراز و با مهار رقابتی، از تشکیل کمپلکس hTERC با واحد کاتالیتیک TERT جلوگیری به عمل می‌آورد؛ روندی که با کوتاه شدن طول تلومر، الحاق کروموزومی، شکست‌های کروموزومی و توقف تقسیم میتوزی همراه می‌شود(۹، ۸). تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که GRN163L ، داروی مناسبی در مهار تلومراز و جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی در بدخیمی‌هایی هم چون CLL، سرطان پروستات، سرطان مری، مالتیپل میلوما و بسیاری دیگر از بدخیمی‌ها می‌باشد(۱۰، ۹).

علی‌رغم این که درمان بیماران APL با سه استراتژی ATRA ،ATO و داروهای شیمی‌درمانی موجب تحولی عظیم در درمان بیماران شده است، با این حال مواردی از بیماری مشاهده می‌شود که در برابر این درمان‌ها مقاومت می‌کنند(۱۲، ۱۱). مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که نزدیک به ۹۰ ٪ از بیماران APL، به طور قابل توجهی دارای تلومرهای کوتاه(متوسط TRF: kb ۳/۵) می‌باشند که این امر بازگوکننده افزایش فعالیت پرولیفراتیو سلول‌ها در این بیماری است(۱۳). هم چنین بیان شده‌است که طول تلومری کوتاه و افزایش فعالیت تلومراز در بیماران APL ، با پیشرفت و عود بیماری مرتبط بوده و نشان‌دهنده زیر مجموعه‌ای از بیماران با بیماری تهاجمی‌تر و علائم بالینی شدیدتر است(۱۴، ۱۳). از طرفی دیگر تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که سلول‌هایی با تلومر کوتاهتر و فعالیت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

تلومراز بالاتر، بیشتر از درمان ضد تلومراز بهره‌مند خواهند شد(۱۵)؛ لذا چشم‌انداز اضافه‌کردن درمان‌های مبتنی بر مهار تلومراز می‌تواند در بیماران APL امیدوارکننده باشد و به نظر می‌رسد این بیماران، کاندید مناسبی برای درمان با مهارکنندگان تلومراز باشند(۱۶). به این منظور و برای بررسی کارآیی استفاده از استراتژی درمان آنتی‌تلومراز در بیماری APL ، نوعی الیگونوکلئوتید در این مطالعه طراحی و نتایج حاصل از تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های متفاوت این الیگونوکلئوتید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (رده سلولی انسانی APL) به صورت سوسپانسیون در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۲mM از L– گلوتامین، FBS ٪۱۰، پنی‌سیلین به میزان U/mL ۱۰۰ و استرپتومایسین به میزان µg/mL ۱۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ٪۵ از CO_2 کشت داده شدند. سلول‌های NB4 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد و برای بررسی حضور (t(۱۵:۱۷ ، روش استاندارد کاریوتایپینگ انجام شد. هم‌چنین این رده سلولی برای حضور mRNA ژن ترکیبی PML/RARα نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

طراحی الیگونوکلئوتید:

در این مطالعه با توجه به تحقیق و مطالعه فراوان بر روی ساختار الیگونوکلئوتیدهای تجاری و اعمال تغییرات بر روی ساختار شیمیایی آن‌ها، الیگونوکلئوتید جدیدی برای مهار آنزیم تلومراز طراحی شد. بدین ترتیب که الیگونوکلئوتید از ۱۳ واحد نوکلئوتیدی '3 -'5 TAGGGTTAGACAA- اصلاح شده با ساختار 'N3'→P5' تیوفسفرآمید(phosphothioate linkage) تشکیل شده که مکمل منطقه RNA تلومراز می‌باشد. شایان ذکر است اصلاح جایگاه‌های تیو فسفرآمید، ارتباط داخل نوکلئوزیدی با RNA را برای ثبات ترمودینامیکی بالا و نیمه عمر طولانی الیگونوکلئوتید فراهم می‌کند؛ همچنین اصلاحات تیوفسفرآمید سبب مقاومت الیگونوکلئوتید در شرایط اسیدی و در برابر نوکلئازها می‌شود. در ضمن لازم به ذکر است که با تغییر در سکانس نوکلئوتیدی، الیگونوکلئوتید دیگری به عنوان الیگونوکلئوتید کنترل طراحی شد.

تیمار دارویی سلول‌ها با الیگونوکلئوتید به روش ترانسفکشن :

برای تیمار دارویی سلول‌ها با الیگونوکلئوتید طراحی شده از روش ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ تهیه شده از شرکت اینویتروژن استفاده شد. در این روش سلول‌های NB4 به تعداد ۷۰۰۰ سلول با استفاده از محیط RPMI حاوی FBS بدون آنتی بیوتیک در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند. طبق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت اینویتروژن، عمل ترانسفکشن با الیگونوکلئوتید در غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار و غلظت ثابت µL ۰/۲۵ لیپوفکتامین بر روی سلول‌های NB4 انجام گرفت؛ سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ٪۵ CO_2 انکوبه شده و پس از گذشت ۶ ساعت محیط کشت سلول‌ها که حاوی الیگونوکلئوتید بود با محیط RPMI حاوی FBS بدون آنتی‌بیوتیک جایگزین شده و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر انکوبه شدند.

کسب غلظت بهینه الیگونوکلئوتید و بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها:

در این مطالعه به منظور به‌دست آوردن غلظت بهینه الیگونوکلئوتید طراحی شده مهارکننده تلومراز و همچنین بررسی تاثیر سایتوتوکسیک الیگونوکلئوتید بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، از روش MTT استفاده شد. برای این کار از پلیت ۹۶ چاهکی و با مقادیرمتفاوت ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار الیگونوکلئوتید و ۰/۲۵ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ استفاده شد. پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شدند و ۶ ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط سلول‌ها با محیط RPMI دارای FBS ٪۱۰ تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، آزمون MTT انجام شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شده و پلیت به مدت ۵ دقیقه شیک و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. سپس پلیت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتریفوژ گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

سپس مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی تـه هـر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه گردیـد. پـس از مخلوط نمودن به مـدت ۵ دقیقـه، پلیـت را بـه مـدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. سپس جهـت خواندن جذب نوری چاهک‌ها، پلیت را در دسـتگاه الایـزا ریدر قرار داده و در طول موج ۵۷۰ نـانومتر جـذب نـوری قرائت شد. به منظور افزایش بهره وری و بررسی مقایسه‌ای، تمامی آزمایش‌ها برای هر دوز به صورت تری‌پلیکیت انجام شد. میزان زنده‌مانی ایجاد شده با توجه به میـانگین مقـادیر OD از پلیـت MTT کـه توسـط دسـتگاه الایـزا ریـدر بـه دست‌آمده است طبق فرمول زیر محاسبه شد:

تعداد سلول‌های زنده
۱۰۰ × ـــــــــــــــــــــــــ = درصد زنده‌مانی سلول‌ها
مجموع سلول‌های زنده و مرده

استخراج RNA:

برای استخراج RNA ابتدا سلول‌ها با لیپوفکتـامین ۲۰۰۰ و الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز ترانسفکت شده و بعـد از ۶ ساعت از ترانسفکشن، با محیط RPMI60 حاوی FBS 10% تعویض محیط صورت گرفت و به مدت ۴۸ سـاعت در ۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد انکوبـه شـدند. پـس از تیمـار، سلول‌ها جمع‌آوری شـده و RNA سـلول‌هـا بـا اسـتفاده از کیـت High Pure RNA Isolation شـرکت روش اسـتخراج شد و مقدار RNA بـا روش تعیـین جـذب نـوری (OD) و میـزان جـذب در طـول مـوج ۲۶۰ nm توسـط دسـتگاه نـانودراپ ND-1000 (نـانودراپ تکنولـوژیس – ویـل مینگتون) اندازه‌گیری شد. هم چنین بـرای بررسـی کیفیـت RNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر از RNA اسـتخراج شـده را بر روی ژل آگـاروز ۱/۵٪ بـا ولتـاژ ۱۴۰ولـت در تانـک الکتروفورز به مدت ۱۵ دقیقه الکتروفورز کردیم.

ساخت cDNA:

بـرای سـاخت cDNA در ایـن تحقیـق از کیـت PrimeScript™ RT reagent (تاکارا بیو) استفاده شد. بـرای هر نمونه استخراج شده RNA ، یک لوله نـیم میلـی‌لیتـری انتخاب شد. برای ساخت cDNA با توجه به تعداد نمونه‌ها میزان مورد نیاز Master Mix تهیه گردید. حجم مـورد نظـر بـرای سـاخت cDNA ، ۲۰ میکرولیتـر بـوده و محتویـات Master Mix بـرای هـر واکـنش شـامل ۴ µL بـافر ۵ X ، PrimeScript™ RT Enzyme ۱ µL از ، PrimeScript™ ۱ µL از آغـازگر Oligo dT (۵۰ µM)، ۱ µL از ۶ mers Random (۱۰۰ µL) و ۱ µg از RNA مورد نظر می‌باشد که در نهایت با آب DEPC حجم مورد نظر بـه ۲۰ میکرولیتـر رسانده مـی‌شـود. سـپس لولـه‌هـا ۱۵ دقیقـه در ۳۷ درجـه سانتی‌گراد جهت انجام رونویسی معکوس و ۵ ثانیـه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد جهت غیرفعال شـدن آنـزیم نسـخه‌بـردار معکوس توسط تیمار حرارتی در دستگاه PCR قرار گرفتند. cDNA ساخته شده در ۲۰- درجه سـانتی‌گـراد نگهـداری شد.

ارزیابی بیان ژن با Real-Time PCR:

آزمون Real-Time PCR با استفاده از دسـتگاه Applied Biosystems StepOnePlus™ و در حجـم ۲۰ میکرولیتـر انجام شد. به ازای هر واکـنش، ۱۰ µL از SYBR® Premix (2X) Ex Taq ™ ، ۲ µL از محصـول cDNA ، ۰/۵ µL از هـر یـک از آغازگرهـا(۱۰ pMol) و ۷ µL آب عـاری از نوکلئاز اضافه شد(جدول۱). شـرایط دمـایی مـورد اسـتفاده شامل یک مرحلـه آمـاده‌سـازی اولیـه در دمـای ۹۵ درجـه سانتی‌گراد بـه مـدت ۳۰ ثانیـه و سـپس ۴۰ چرخـه بـرای دناتوراسـیون(۵ ثانیـه در ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد) و مرحلـه آنیلینگ/اکستنشن توأم (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گـراد) بود. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنـی ذوب مورد بررسـی قـرار گرفـت. از جملـه مزایـای Real-Time PCR ، ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می‌شود و در واقـع نـوعی بررسـی کیفی محسوب می گردد. دمایی که در آن DNA دو رشته‌ای دناتوره یا از هم باز می‌شود، نقطه ذوب خوانده می‌شود. از آن جـایی کـه SYBR Green نمـی‌توانـد بـین محصـولات مختلف تفاوتی قائل باشد، می‌تـوان بـا اسـتفاده از منحنـی ذوب(Melting Curve) تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد. در ایـن آزمـون از ژن HPRT بـه عنـوان ژن مرجع استفاده شد. از آن جایی که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلـف تفـاوتی قائل باشد، با استفاده از منحنی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

جدول ۱: توالی آغازگرهای به کار رفته در مطالعه جهت آزمون Real-Time PCR

ژن	آغازگر جلوبرنده('3-'5)	آغازگر معکوس('3-'5)	اندازه(bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲
Bcl-۲	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	۹۰

ذوب اختصاصیت محصولات در فرآیند PCR مشخص گشت. در انتها برای محاسبه تعداد نسخه mRNA تکثیر شده، از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد.

آنالیز آماری:

برای انجام مطالعه‌های آماری از SPSS ۱۸ استفاده شد. اختلاف معنادار بین متغیرهای آزمایش با استفاده از آزمون student two tailed تعیین شد. مقادیر به دست آمده با $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز به صورت وابسته به دوز باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌های NB4 می‌شود:

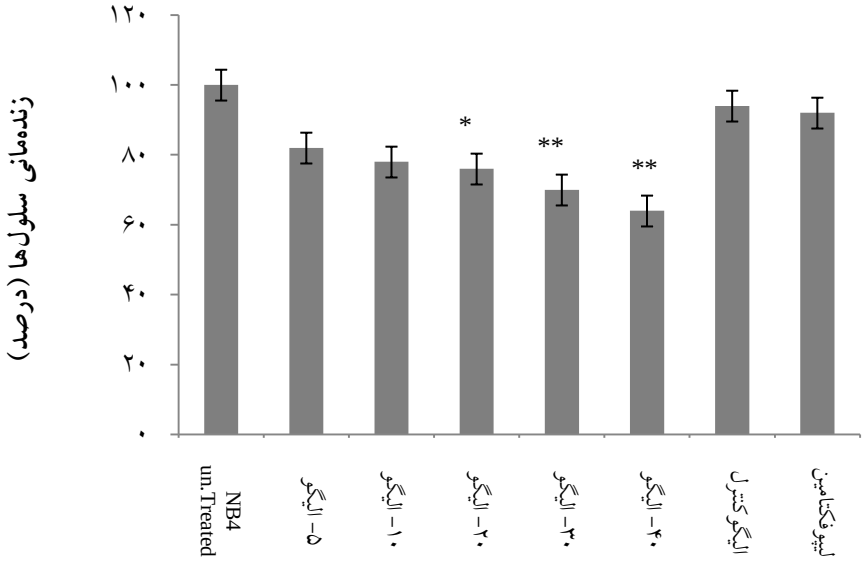
با استفاده از روش MTT ، مقادیر غلظت بهینه الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز تعیین شد. در این روش مقادیر متفاوتی از الیگونوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفت و زنده‌مانی سلول‌ها پس از گذشت ۴۸ ساعت محاسبه شد. نتایج زنده‌مانی به دست آمده از MTT در غلظت‌های ۵ ، ۱۰، ۲۰ ،۳۰ ،۴۰ و ۵۰ پیکومولار الیگونوکلئوتید به ترتیب: ۸۲٪، ۷۸٪ ، ۷۴٪ ،۷۰٪ ، ۶۴٪ و ۸۹٪ بودند(نمودار ۱).

با توجه به نتایج، دوز pMol ۴۰ این مهارکننده به عنوان دوز بهینه در نظر گرفته شد. از الیگونوکلئوتید کنترل و سلول‌های NB4 که عمل تیمار بر روی آن‌ها انجام نگرفته بود، به عنوان کنترل استفاده شد و برای بررسی اثر سمیت لیپوفکتامین بر روی سلول‌ها، خود لیپوفکتامین نیز به تنهایی بر روی سلول‌ها ریخته شد. طی نتایج به دست آمده مشاهده شد که لیپوفکتامین بر روی سلول‌ها اثر سمی نداشته و نتیجه زنده‌مانی حاصل از الیگونوکلئوتید کنترل در غلظت pMol ۴۰ نیز ۹۴٪ می‌باشد.

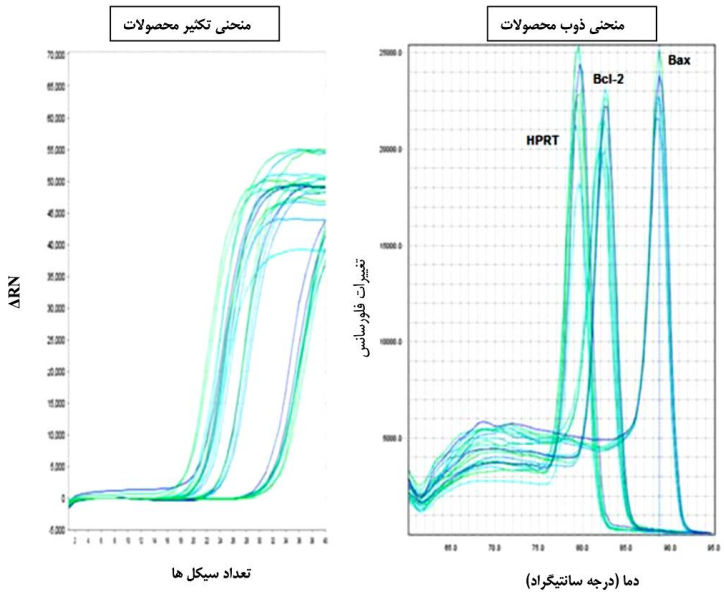
تاثیر الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز بر روی بیان ژن Bax و Bcl-۲ :

به دنبال اثرات سایتوتوکسیک الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز، در این مطالعه به بررسی ژن‌های کلیدی دخیل در القای مرگ سلولی و آپوپتوز پرداختیم. پس از انجام Real-Time PCR ، آنالیز منحنی ذوب نشان می‌دهد که هیچ گونه آغازگر دایمر و یا تکثیر DNA های اضافی وجود نداشته و رشته DNA تکثیر شده به طور اختصاصی رشته DNA ژن هدف (*Bax*) می‌باشد(شکل ۱). غلظت بهینه pMol /µL ۴۰ به دست آمده از الیگونوکلئوتید طراحی شده سبب افزایش بیان ژن *Bax* به میزان ۱/۲ برابر در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده NB4 شده است، این در حالی‌است که تغییر معناداری در بیان این ژن به واسطه تیمار سلول‌ها با الیگونوکلئوتید کنترل مشاهده نمی‌شود(نمودار ۲). هم چنین بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که غلظت بهینه pMol ۴۰ الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز، موجب کاهش بیان ژن *Bcl* ۲ به میزان ۰/۳ برابر شده است، این در حالی است که الیگونوکلئوتید کنترل تاثیری در کاهش بیان این ژن نداشته است(نمودار ۲). به منظور بررسی تغییر بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl* ۲ در تعیین سرنوشت سلول، نسبت *Bax/Bcl* ۲ اندازه‌گیری شد. نتیجه به دست آمده نشان داد که نسبت *Bax/Bcl-*۲ در سلول‌های NB4 تیمار شده با الیگونوکلئوتید به میزان ۱/۷ برابر افزایش داشته است، ولی در تیمار این سلول‌ها با الیگونوکلئوتید کنترل، افزایشی مشاهده نشد(نمودار ۳). هر چند که تغییرات ژن‌های *Bax* و *Bcl* ۲ به تنهایی تفاوت چشمگیری با کنترل نداشته است اما نسبت *Bax/Bcl* ۲ که تعیین کننده بقا یا مرگ سلول می‌باشد، به طور معناداری افزایش پیدا کرده است که بیانگر القای مرگ سلولی می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

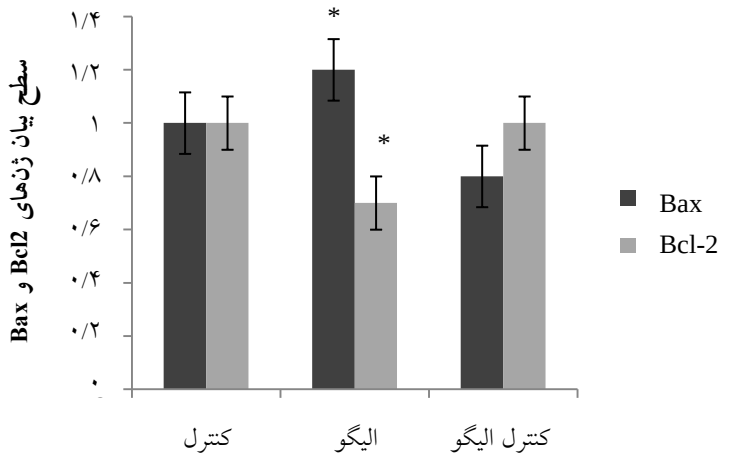


نمودار ۱ : تعیین دوز بهینه الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز سلول‌های NB4 در تعداد ۷۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه‌ای به روش ترانسفکشن تحت تاثیر مقادیر مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار الیگونوکلئوتید و ۰/۲۵ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ قرارگرفته و پس از مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون، درصد زنده‌مانی آن‌ها محاسبه شد. نتایج نشان داد که با بالارفتن غلظت الیگونوکلئوتید مرگ سلولی در این سلول‌ها بیشتر شده و بیشترین مرگ سلولی در غلظت pMol/µL ۴۰ مشاهده شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده(۰/۰۰۱ >p * ؛ ۰/۰۱ >p ** ؛ ۰/۰۵ >p *) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد.**

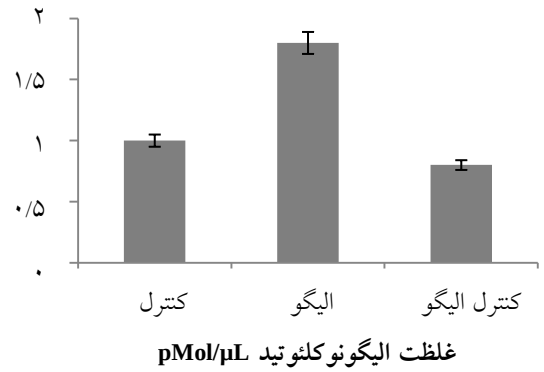


شکل ۱ : منحنی ذوب(راست) و منحنی تکثیر (چپ) ژن‌های مورد بررسی: همان طور که در شکل دیده می‌شود، پس از مشتق‌گیری منحنی درجه دومی به دست می‌آید که وجود پیک‌های ذوب با نقاط ماکزیمم واحد فلورسانس دلالت بر این امر دارد که رشته DNA تکثیر شده به طور اختصاصی رشته ژن مورد هدف Bax ,Bcl-۲ و ژن مرجعHPRT می‌باشد. از آنجا که دمای ذوب محصولات PCR با طول و توالی‌های مختلف متفاوت است، لذا با استفاده از نمودار دمای ذوب (Melting Curve) می‌توان DNA دو رشته‌ای هدف را شناسایی کرد. ΔRN : افزایش فلئورسانس نرمالیزه شده (Rn) در طول PCR

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]



نمودار ۲: تغییرات سطوح mRNA ژن‌های *Bax* و *Bcl-۲* در تیمار دارویی با الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز: نتایج به دست آمده از تیمار سلول‌ها با الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز و اثر آن بر روی بیان ژن‌های *Bcl-۲* , *Bax* مبین این موضوع است که غلظت بهینه ۴۰ pMol/ µL الیگونوکلئوتید سبب افزایش بیان ژن *Bax* به میزان ۱/۲ برابر و کاهش بیان ژن *Bcl-۲* به میزان ۳/. برابر در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده شده است. همان طور که در این نمودار نشان داده شده است، الیگونوکلئوتیدکنترل در غلظت ۴۰ pMol/ µL اثری بر روی بیان ژن *Bax* و *Bcl-۲* نداشته است. میانگین و انحراف معیار نتایج به دست آمده از دو ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه شد. هم چنین مقادیر p value به دست آمده آزمایش(۰/۰۰۱ >p * ؛ ۰/۰۱ >p ** ؛ ۰/۰۵ >p *) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. مقادیر p value به دست آمده برای ژن *Bax* و *Bcl-۲* در تیمار با غلظت ۴۰ پیکومولار الیگونوکلئوتید به ترتیب ۰/۰۱۲۶ و ۰/۰۳۲۴ است.**



نمودار ۳ : تغییرات نسبت ژن‌های *Bax/Bcl-۲* در تیمار سلول‌های NB4 با الیگونوکلئوتید تیمار سلول‌ها با الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز باعث افزایش نسبت ژن‌های *Bax/Bcl-۲* در غلظت اپتیموم ۴۰ pMol/ µL می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از دو ران کاری مختلف(mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (۰/۰۰۱ >p * ، ۰/۰۱ >p ، ۰/۰۵ >p *) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.**

بحث

مشخص شده است که سلول‌هایی با تلومر کوتاهتر و فعالیت تلومراز بالاتر، بیشتر از درمان ضد تلومراز بهره‌مند خواهند شد؛ لذا چشم‌انداز اضافه‌کردن درمان‌های مبتنی بر مهار تلومراز می‌تواند در بیماران APL امیدوار کننده باشد(۱۷). الیگونوکلئوتیدهای مختلفی طراحی شده‌اند که به‌عنوان یک آنتاگونیست تلومراز عمل کرده و تمایل زیادی به منطقه الگوی RNA تلومراز (hTR) دارند. در واقع این مهارکننده‌ها با ممانعت از مونتاژ آنزیم تلومراز، مانع از فعالیت این آنزیم می‌شوند (۱۸). با توجه به مطالعات گذشته و به منظور بررسی استراتژی کارایی درمان آنتی تلومراز در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، در این مطالعه سلول‌های لوسمیک NB4 تحت غلظت‌های متفاوتی از الیگونوکلئوتید طراحی شده قرار داده شد. پس از انجام آزمایش‌ها مشخص گردید که دوز بهینه الیگونوکلئوتید قادر است در کوتاه مدت منجر به افزایش مرگ سلول‌های NB4 و کاهش درصد زنده‌مانی این سلول‌ها شود. مطالعه‌هایی که بر روی سلول‌های سرطانی مری و مالتیپل میلوما انجام گرفت نیز حاکی از این واقعیت است که تیمار کوتاه مدت سلول‌های سرطانی و تومووری با

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

الیگوکلئوتید GRN163، موجب افزایش نقاط آسیب دیده و شکست‌های DNA (DSB) و لذا افزایش پاسخ های آسیب DNA (DDR) و در نتیجه افزایش مرگ‌سلولی و مهار رشد سلول‌های توموری این سلول‌ها می‌شود(۱۹، ۱۷). مشخص شده است که در برخی موارد، مهار تلومراز مستقل از کوتاه‌شدن تلومر و احتمالاً از طریق پاسخ آسیب DNA (DNA damage response) سبب القای مرگ سلولی می‌گردد(۲۰). تحقیقات نشان می‌دهند برهم خوردن آرایش ساختمانی تلومرها و باز شدن T Loop تلومر تحت تاثیر الیگونوکلئوتیدها و در دسترس قرارگرفتن پروتئین‌های TRF2 و POT1 از کمپلکس شلترین(Shelterin) تلومر می‌تواند باعث فعال‌شدن مکانیسم‌های ترمیم آسیب DNA شود(۲۲، ۲۱). هم چنین فعال شدن این پاسخ‌ها باعث به خدمت گرفتن پروتئین p53 و فعال‌سازی پاسخ ATM می‌شود که به نوبه خود منجر به تشکیل کانون‌هایی ناشی از اختلال عملکرد تلومر و شکست‌هایی بر روی DNA می‌گردد که این مناطق موجب فعال شدن مکانیسم‌های ترمیم آسیب DNA و سبب القای پدیده پیری و آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود(۲۴، ۲۳). هم چنین جهت مطالعه مکانیسم مولکولی دخیل در القای مرگ سلولی در سلول‌های NB4 ، در این مطالعه به بررسی تغییرات بیان ژن *Bax* و *Bcl-۲* پرداخته شد. ژن *Bax* یکی از اعضای پروآپوپتوتیک خانواده Bcl-۲ است که باعث پیشبرد آپوپتوز با نقش آنتاگونیستی برای Bcl-۲ می‌شود(۲۶، ۲۵). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز باعث افزایش بیان ژن *Bax* و کاهش بیان ژن *Bcl-۲* در سطح mRNA می‌شود. بنابراین می‌توان متصور شد که الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز احتمالاً از طریق تنظیم فعالیت رونویسی Bcl-۲ و Bax ، که نقش مرکزی را در تنظیم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده دارند، سبب القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمیک پرومیلوسیتی می‌گردند. هم چنین در این بررسی افزایش نسبت *Bax/Bcl* ۲ ، بیان‌کننده سیر پروآپوپتوتیک در سلول‌هایNB4 در اثر تیمار با این دارو می‌باشد. در نتیجه در مطالعه انجام شده مشخص شد که الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز در کوتاه‌مدت دارای اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک بر روی سلول‌های پرومیلوسیتیک حاد NB4 می‌باشد که احتمالاً این اثرات می‌تواند به واسطه افزایش ژن‌های پروآپوپتوتیکی هم چون Bax و کاهش ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک کلیدی مانندBcl-۲ در این سلول‌ها باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به طول تلومر بیماران APL و فعالیت بالای آنزیم تلومراز و همچنین اثر بخشی الیگونوکلئوتید طراحی شده بر روی سلول‌های پرومیلوسیتیک NB4 ، به نظر می‌رسد استفاده از الیگونوکلئوتید مهارکننده تلومراز می‌تواند راه‌کاری جدید در درمان این بیماران باشد.

References :

1- Grimwade D, Mistry AR, Solomon E, Guidez F. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. Cancer Treat Res 2010; 145: 219-35.
2- Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, *et al*. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic lLeukemia. New Engl J Med 2013; 369(2): 111-21.
3- Sirulnik A, Melnick A, Zelent A, Licht JD. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. Best Pract Res Clin Haematol 2003; 16(3): 387-408.
4- Lou Y, Suo S, Tong H, Ye X, Wang Y, Chen Z, *et al*. Characteristics and prognosis analysis of additional chromosome abnormalities in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide as the front-line therapy. Leuk Res 2013; 37(11): 1451-6.
5- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. Nat Med 2006 ; 12(10): 1133-8
6- Blackburn EH, Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011; 3(5): a003558.
7- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. Nat Med 2006; 12(10): 1133-8.
8- Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. Cancer Treat Rev 2013; 39(5): 444-56.
9- 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

10- Buseman CM, Wright WE, Shay JW. Is telomerase a viable target in cancer? Mutat Res 2012; 730(1-2): 90-7.
11- Yang L, Wang W, Hu L, Yang X, Zhong J, Li Z, *et al*. Telomere-binding protein TPP1 modulates telomere homeostasis and confers radioresistance to human colorectal cancer cells. PLoS One 2013; 8(11): e81034.
12- De Botton S, Sanz M, Chevret S, Dombret H, Martin G, Thomas X, *et al*. Extramedullary relapse in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. Leukemia 2006; 20(1): 35-41.
13- Ghaffari SH, Shayan-Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Ann Oncol 2008; 19(11): 1927-34.
14- 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, 514.
15- Ghaffari H, Jamialahmadi AH, Shayan-Asl N, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in AML-M3 patients. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research 2009; 3(2): 5-9.
16- Bashash D, Ghaffari SH, Zaker F, Kazerani M, Hezave K, Hassani S, *et al*. BIBR 1532 increases arsenic trioxide-mediated apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells: therapeutic potential for APL. Anticancer Agents Med Chem 2013; 13(7): 1115-25
17- Ghaffari S, Shayan-Asl N, Jamialahmadi A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. Ann Oncol 2008; 19(11): 1927-34.
18- Akiyama M, Hideshima T, Shammas MA, Hayashi T, Hamasaki M, Tai YT, *et al*. Effects of oligonucleotide N3′ --> P5′ thio-phosphoramidate (GRN163) targeting telomerase RNA in human multiple myeloma cells. Cancer Res 2003; 63(19): 6187-94.
19- Kedde M, le Sage C, Duursma A, Zlotorynski E, van Leeuwen B, Nijkamp W, *et al*. Telomerase-independent regulation of ATR by human telomerase RNA. J Biol Chem 2006; 281(52): 40503-14.
20- Wu X, Smavadati S, Nordfjäll K, Karlsson K, Qvarnström F, Simonsson M, *et al*. Telomerase antagonist imetelstat inhibits esophageal cancer cell growth and increases radiation-induced DNA breaks. Biochim Biophys Acta 2012; 1823(12): 2130-5
21- Ortiz R, Melguizo C, Prados J, Alvarez PJ, Caba O, Rodriguez-Serrano F, *et al*. New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. Recent Pat Anticancer Drug Discov 2012; 7(3): 297-312.
22- Gryaznov SM, Jackson S, Dikmen G, Harley C, Herbert B-S, Wright WE, *et al*. Oligonucleotide conjugate GRN163L targeting human telomerase as potential anticancer and antimetastatic agent. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2007; 26(10-12): 1577-9.
23- Huda N, Tanaka H, Mendonca MS, Gilley D. DNA damage-induced phosphorylation of TRF2 is required for the fast pathway of DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol 2009; 29(13): 3597-604.
24- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, *et al*. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature 2003; 426(6963): 194-8.
25- Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. J Biol Chem 2004; 279(3): 2077-84.
26- He YC, Zhou FL, Shen Y, Liao DF, Cao D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. Int J Mol Sci 2014; 15(5): 8335-51.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 13(1): 1-10

Original Article

Induction of cell death and apoptosis in NB4 promyelocytic leukemic cells using Oligonucleotide as a telomerase antagonist

Asghari Kia L.[1], Bashash D.[1], Ghaffari S.H.[2], Hamidpour M.[3], Ghavamzadeh A.[2]

[1]Department of Hematology, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by a specific t(15;17), distinct morphologic picture, and a clinical coagulopathy that contributes to the morbidity and mortality of the disease. Telomerase is consistently activated in nearly all APL patients and telomerase-mediated telomere stabilization is responsible for unlimited replicative potential of the disease. This study aimed to investigate the effects of designed oligonucleotide as a telomerase inhibitor on NB4 cells.

Materials and Methods

NB4 leukemic cells were treated with various concentrations of oligonucleotide by transfection method using lipofectamin 2000. The inhibitory effect of oligonucleotide on cell metabolic activity and cell viability was assessed by MTT assay. Quantitative real-time PCR were applied to investigate alteration of Bax and Bcl-2 mRNA levels.

Results

Oligonucleotide decreased cell viability index and exerted cytotoxic effect against NB4 leukemic cells; we found that exposing cells with Oligonucleotide at 40 pMol for 48 h induced cell death and apoptotic effects on NB4 cells. Furthermore, transcriptional suppression of Bcl-2 and upregulation of Bax were found upon NB4 treatment by oligonucleotide.

Conclusions

Based on the short telomere length and high terlomerase activity in APL as well as inhibitory effect of oligonucleotide against NB4 cells, anti-telomerase-based therapy might be regarded as a successful strategy in APL therapy.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, Apoptosis, Cell Death

Received: 18 Mar 2015
Accepted: 28 Oct 2015

Correspondence: Ghaffari SH., PhD of Molecular Genetics. Associate Professor of 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 2025-07-02]