Original Article

The Role of Leptin in Pathophysiology of Myeloma Cells

Najmeh Vaghef, M.Sc.[1], Saeid Abroun, Ph.D.[1]*, Saeid Kaviani, Ph.D.[1], Kamran Alimoghadam, M.D.[2], Sharbanoo Rostami, M.Sc.[1], Bahare Sadeghi, M.Sc.[1], Najmedin Saki, M.Sc.[1], Gholamreza Khamisipour, M.Sc.[1],

1. Hematology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Hematology and Oncology Research Center, Shariati Hospital, Tehran Medical Sciences University, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Hematology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran***
Email: abroun@modares.ac.ir

Received: 2/Jun/2010, Accepted: 21/Sep/2010

Abstract

Objective: In order to achieve the best therapeutic strategy with which to treat multiple myeloma (MM), it is necessary to understand the molecular mechanisms of myeloma cell growth. In addition to genetic defects, the bone marrow microenvironment (BMM) plays a primary role in MM pathophysiology. For many years, interleukin-6 (IL-6) was considered to be a central growth factor in myeloma cells. However, recent evidence indicates that increasing numbers of cytokines enhance myeloma cell growth in BMM. In this study, we investigated the possibility that leptin could be a member of cytokine network that supports myeloma cells.

Materials and Methods: The expression of leptin and its receptors in cell lines, bone marrow (BM) and mononuclear peripheral blood (PB) were analysed by RT-PCR. Additionally, leptin serum levels were analysed by ELISA and the effect of leptin on growth of cell lines by cell culture.

Results: According to our results,leptin and its receptors were expressed in cell lines, myeloma BM and PB mononuclear cells (MNC). However the PB mononuclear cells of treated myeloma patients did not express leptin and differed in the expression of leptin receptors. Acute lymphoid leukemia, B-blasts (B-ALL) did not express leptin and its receptors. Untreated myeloma and B-ALL patients had high and low levels of leptin in their serum, respectively. Recombinant exogenous leptin enhanced the growth of RPMI8866 but did not affect the growth of U266 and Jurkat.

Conclusion: Regarding this study and the findings of other studies, leptin may play a role in MM pathophysiology. Therefore leptin and its receptors might be analysed as a therapeutic target for myeloma BMM.

Keywords: Multiple Myeloma, Leptin, U266 Cell Line

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 319-328

Archive of SID

www.SID.ir

نقش لپتین در پاتوفیزیولوژی سلول‌های مایلومایی

نجمه واقف .M.Sc[1]، سعید آبرون .Ph.D[1*]، سعید کاویانی .Ph.D[1]، کامران علی مقدم .M.D[2]،
شهربانو رستمی .M.Sc[1]، بهاره صادقی .M.Sc[1]، نجم‌الدین ساکی .M.Sc[1]، غلامرضا خمیسی‌پور .M.Sc[1]

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه خون‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات خون و آنکولوژی بیمارستان شریعتی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه خون‌شناسی
پست الکترونیک: Email: abroun@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۱۲، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۳۰

چکیده

* **هدف:** بررسی نقش احتمالی لپتین به عنوان عضوی از شبکه سایتوکاینی شرکت کننده در حفظ حیات سلول‌های مایلومایی

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از تکنیک‌های RT-PCR برای ارزیابی بیان ژن‌های لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک هسته‌ای نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی بیماران مایلومایی، ELISA برای اندازه‌گیری میزان لپتین سرم این بیماران و از Cell Culture به منظور بررسی اثر لپتین بر رشد رده‌های سلولی در *in vitro* استفاده شده است.

* **یافته‌ها:** رده‌های سلولی و تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان و خون محیطی بیماران مایلومایی درمان نشده لپتین و گیرنده‌های آن را بیان نمودند اما بیماران درمان شده لپتین را بیان نکرده، بیان متفاوتی از گیرنده‌ها را نشان دادند. در بلاست‌های (Acute lymphoid leukemia, B-blasts; B-ALL) بیان لپتین و گیرنده هایش مشاهده نگردید. میزان لپتین سرم بیماران مالتیپل مایلوما و B-ALL به ترتیب افزایش و کاهش نشان دادند . لپتین سبب افزایش رشد رده سلولی RPMI8866 گردید، اما بر رشد رده‌های سلولی U266 و Jurkat اثری نداشت.

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های فوق، ممکن است لپتین در پاتوفیزیولوژی مالتیپل مایلوما نقش داشته باشد و بتوان لپتین و گیرنده‌هایش را به عنوان یکی از هدف‌های درمانی، مورد مطالعه قرار داد.

* **کلیدواژگان:** مالتیپل مایلوما، لپتین، رده سلولی U266

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۲۸-۳۱۹

مقدمه

مالتیپل مایلوما (Multiple Myeloma) یک نوع بدخیمی پلاسما سل است که حدود ۱۰درصد ازسرطان‌های خون را به خود اختصاص می‌دهد و از نظر شیوع، دومین سرطان خون بعد از لنفوم غیرهوجکین می‌باشد. بیماران مبتلا به مایلوما از استئوپروز و درد شدید استخوان رنج می‌برند. از دیگر علائم مایلوما می‌توان به ترشح فاکتورهای فعال‌کننده استئوکلاست‌ها (Osteoclast Activating Factor; OAF) از پلاسماسل‌های بدخیم، نقص در عملکرد کلیه به دلیل افزایش کلسیم خون و دفع پروتئین بنس‌جونس، کم‌خونی به دلیل اختلال در هماتوپوییسیس در نتیجه جای‌گیری سلول‌های بدخیم در مغز استخوان و عفونت‌های مکرر به دلیل ناکارآمد بودن انبوه ایمونوگلبولین‌های تولید شده، اشاره نمود (۳-۱).

اعتقاد بر این است که مالتیپل مایلوما توسط آسیب‌های ژنتیکی مانند جابه‌جایی‌های کروموزومی که سبب قرارگیری آنکوژن در کنار ژن سازنده زنجیره‌های ایمونوگلوبولین می‌شود، ایجاد می‌گردد. این جابه‌جایی افزایش بیان آنکوژن را به دنبال خواهد داشت. سیگنال‌هایی که سبب حفظ، بقا و رشد سلول شده، تحریک می‌شود و سیگنال‌هایی که سبب آپوپتوز می‌باشند، غیرفعال می‌گردند (۷-۴).

شناخته‌شده‌ترین فاکتور رشد مایلوماسل‌ها اینترلوکین-۶ (Interlukin-6; L-6) می‌باشد که تصور می‌شود نقش بسیار مهم را در پاتوژنز ورشد بدخیم سلول‌های مایلومایی ایفا می‌کند (۸، ۹). تحریک سلول‌ها توسط IL-6 سبب انتقال سیگنال JAK/STAT از طریق gp-130 گیرنده IL-6 و فسفریلاسیون STAT3 می‌گردد. این راه انتقال سیگنال پیوسته در سلول‌های بدخیم بیماران مایلومایی و برخی رده‌های سلولی مایلومایی مانند U266 فعال است (۱۲-۹). نشان داده شده است که موش‌هایی که ژن IL-6 آنها سرکوب شده است، توانایی توسعه پلاسماسل‌های توموری را ندارند (۱۳). این مشاهدات اهمیت بالقوه این راه انتقال سیگنال واثر ضد آپوپتوز آن را نشان می‌دهد و آن را هدف اصلی برای مداخلات درمانی قرار می‌دهد. اما نتایج آزمایشات کلینیکی اولیه با آنتی‌بادی‌های ممانعت کننده IL-6 ناامید کننده بوده و نتایج کلینیکی قابل توجهی برای آنها شرح داده نشده است (۱۴). سازگار با این نتایج، سلول‌های مایلومایی که گیرنده IL-6 آنها بلوکه شده است، در هم‌کشتی با سلول‌های استرومای مغز استخوان زنده می‌مانند (۱۰). این نتایج نقش اساسی IL-6 را مورد سوال قرار داده و پیشنهاد می‌کند راه‌های انتقال سیگنال دیگری علاوه بر راه انتقال سیگنال فعال شده توسط IL-6 بر بقای سلول‌های مایلومایی اثر می‌گذارد. بررسی‌های جزیی راه‌های انتقال سیگنال آشکار کردند که در سلول‌های مایلومایی علاوه بر راه انتقال سیگنال JAK/STAT، راه انتقال سیگنال Ras/MAPK نیز فعال است؛ هر چند که IL-6 می‌تواند مسیر MAPK را نیز فعال کند، بلوکه نمودن گیرنده IL-6 فسفوریلاسیون STAT3 را بلوکه می‌نماید اما اثری بر فعال‌سازی MAPK ندارد؛ بنابراین STAT3 از

Archive of SID
www.SID.ir

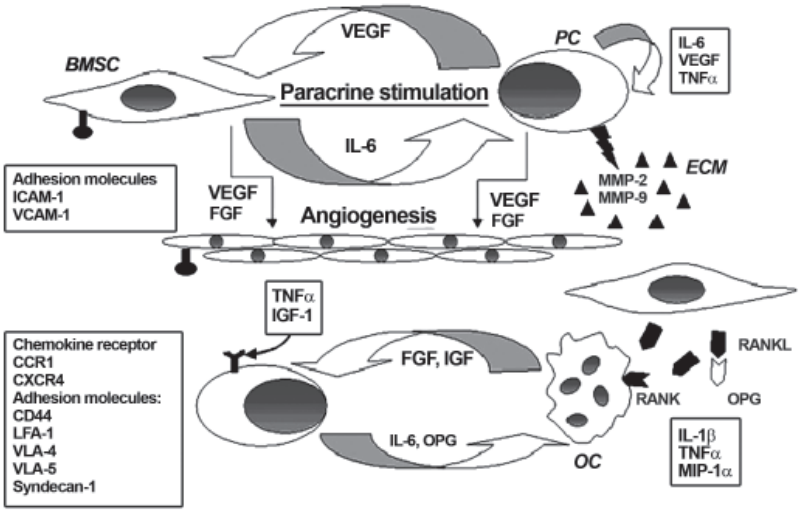
طریق اتصال IL-6 به گیرنده‌اش و راه MAPK توسط مکانیزم‌های وابسته و غیروابسته به IL-6 فعال می‌گردد (۱۰).

بلوکه نمودن راه MAPK به تنهایی اثرات ممانعتی بسیار کمی بر رشد وحیات سلول‌های مایلومایی دارد. اما به طور قطع ممانعت از هر دو راه انتقال سیگنال JAK2/STAT3 و Ras/MAPK سبب آپوپتوز این سلول‌ها می‌گردد . حتی هنگامی که در حال رشد در حضور سلول‌های استرومای مغز استخوان هستند. این امر نشان دهنده نقش مستقل هر دو راه انتقال سیگنال JAK2/STAT3 و Ras/MAPK در رشد و حیات سلول‌های مایلومایی است (۱۰).

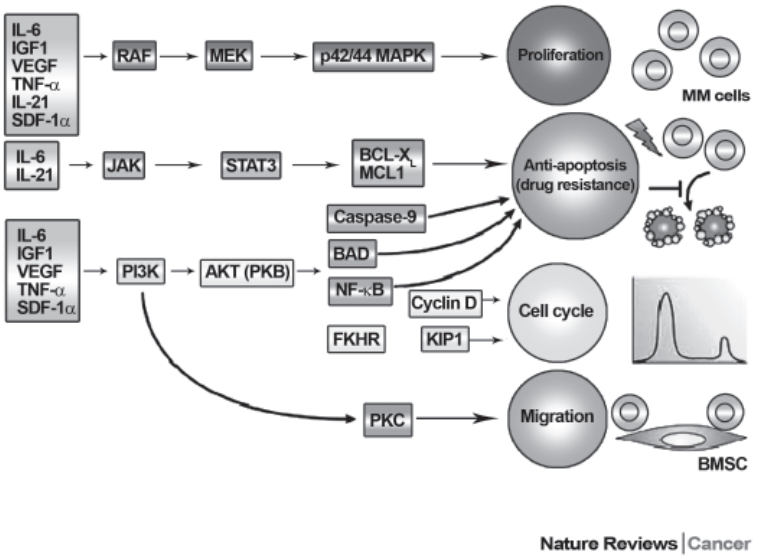
راه‌های انتقال سیگنال و مدیاتورهای مرکزی دیگری که اواخر گزارش شده است به حیات و بقای سلول‌های مایلومایی کمک می‌کند که عبارتند از: Wnt, Notch, PI3K/Akt, NF-kB. واضح است که علاوه بر موتاسیون‌های آنکوژنیک، ریز محیط مغز استخوان در فعال نمودن شبکه ای از راه‌های انتقال سیگنال در سلول‌های مایلومایی، نقش دارد که نتیجه آن حفظ بقای این سلول‌ها وپیشرفت تومور می‌باشد (شکل ۱). علت این امر که راه‌های انتقال سیگنال چگونه با یکدیگر مرتبط هستند، تا حدود زیادی ناشناخته مانده است (۱۸-۱۵).

مطالعات نشان داده است که علاوه بر IL-6 سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد دیگری مانند:

Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α), Transforming Growth Factor Beta (TGF-β), Stromal Cell-Derived Factor 1Alpha (SDF-1α), B-Cell Stimulating Factor 3 (BSF-3), Fibroblast Growth Factor (FGF), Interleukin-21 (IL-21)



شکل ۱: ریزمحیط مغز استخوان در مالتیپل مایلوما



شکل ۲: نقش سایتوکاین‌ها در حفظ بقا و رشد سلول‌های مایلوما

www.SID.ir

به عنوان بخشی از عوامل پاتوژنز در مالتیپل مایلوما مطرح می‌باشد. این سایتوکاین‌ها از سلول‌های استرومایی، اندوتلیالی، استئوکلاست‌ها و سلول‌های مایلومایی ترشح شده، بقا، رشد و مهاجرت سلول‌های مایلومایی و هم‌چنین رگ‌سازی در ریز محیط مغز استخوان را افزایش می‌دهند. بنابراین جهت القای مرگ موثر در سلول‌های مایلومایی به جای ممانعت از یک راه یا سایتوکاین خاص می‌بایست شبکه پیچیده راه‌های انتقال سیگنال در ریزمحیط مغز استخوان مورد هدف درمانی قرار گیرد (شکل ۲).

در این مطالعه با توجه شباهت ساختمانی لپتین به سایتوکاین‌های با زنجیره بلند مارپیچی مانند IL-6، شباهت ساختمانی گیرنده آن به خانواده سایتوکاینی IL-6 (gp-130)، توانایی لپتین در فعال کردن راه‌های JAK/STAT و MAPK و افزایش میزان سرمی لپتین در بیماران مالتیپل مایلوما را داراست. احتمال اینکه لپتین عضوی از شبکه سایتوکاینی شرکت کننده در بقا و رشد سلول‌های مایلومایی باشد، مورد بررسی و بحث قرار گرفته است.

لپتین پپتیدی ۱۶ کیلودالتونی با ۱۶۷ اسید آمینه است؛ به طور عمده توسط آدیپوسایت‌ها تولید می‌شود و نقش اساسی آن در بالانس انرژی بدن می‌باشد به این مفهوم که از طریق گردش خون به مغز رفته و در آنجا بر روی گیرنده‌های خود درهیپوتالاموس اثر نموده سبب کاهش اشتها می‌گردد. لپتین شباهت‌های ساختمانی قابل توجهی با اعضای خانواده سایتوکاینی با زنجیره بلند مارپیچی مانند:

Leukemic Inhibitory Factor (LIF), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Oncostatin-M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1), IL-6, IL-11, IL-12

داراست. لپتین از طریق گیرنده‌های داخل غشایی که شباهت ساختمانی به جز انتقال دهنده سیگنال گیرنده‌های سایتوکاینی کلاس یک (gp-130) مانند گیرنده‌های

Prolactin, Erythropoitin G-csf, Growth Hormon (GH), IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, Leukemic Inhibitory Factor (LIF)

را نشان می‌دهد، از طریق فعال نمودن را ه‌های انتقال سیگنال مختلف مانند JAK/STAT, MAPK, PI3K عمل می‌کند.

لپتین به عنوان یک سایتوکاین چند کاره در همه بافتها عمل می‌کند. به همین دلیل در عملکردهای سلول‌های مختلف درگیر است. لپتین علاوه بر کنترل توده بدن (۱۹)، در تولیدمثل (۲۰)، رگ‌سازی (۲۱)، ایمنی‌زایی (۲۴-۲۲)، هماتوپوییسیس (۲۷-۲۵)، بهبود زخم (۲۸)، بازسازی استخوان (۳۲-۲۹) و عملکرد قلبی-عروقی (۳۳)، دارای عملکرد است.

مواد و روش ها

تهیه نمونه ها

رده‌های سلول

رده‌های سلولی:

1. U266 (Myeloma)
2. RPMI 8866 (B-Lymphoid Leukemia)
3. Jurkat (T cell-Leukemia)
4. 937 (Histiocytic lymphoma)

در محیط کشت RPMI1640، در حضور پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۱۰درصد Fetal Bovin Serum (FBS) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و Co_2 ۵ درصد در فلاسک‌های T25 و T75 با رعایت شرایط استریل کشت داده شد.

نمونه‌های بیماران

نمونه‌های آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی بیماران مراجعه کننده به بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران بر اساس رضایت بیماران و مجوز کمیته اخلاق پزشکی شماره ۱۵۰/۸۲۸۵۹ در ضد انعقاد Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) به میزان ۱/۲ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر خون در لوله‌های پلاستیکی در پیچ دار استریل ۱۵ میلی‌لیتری (لوله‌های فالکون) گرفته شد.

نمونه‌های بیماران شامل:

۱. نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی افرادمبتلا به مالتیپل مایلوما
۲. نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی دو فرد سالم
۳. نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی دو فردمبتلا به Acute lymphoid leukemia, B-blasts (B-ALL) و یک فرد درمان شده Acute Myeloid leukemia (AML)

استخراج RNA رده‌های سلولی و تک‌هسته‌ای‌های مغزاستخوان

برای استخراج RNA، رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI1640 با FBS ۱۰درصد در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و Co_2 ۵ درصد کشت داده شدند. پس از اینکه تعداد آنها به ۱×۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر محیط کشت رسید، از آنها رسوب سلولی تهیه شد. تک‌هسته‌ای‌های نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی نیز که در ضد انعقاد EDTA تهیه شده بودند، به وسیله Ficol-Paque بر اساس Gradient Centrifugation Density جدا شدند. سپس با روش تریزول RNA آنها استخراج شد. به طور خلاصه، پس از اضافه نمودن تریزول (۱×۱۰^۶ سلول بر میلی‌لیتر/ 1ml trizol) به مدت ۱۵ ثانیه کاملا ورتکس نموده، ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده، دوباره ورتکس گردید. در مرحله بعد به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم به ازای هر ۱ میلی‌لیتر تریزول اضافه شد. درب تیوب‌ها را محکم بسته، به شدت با دست یا ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده، ۳ دقیقه در دمای اتاق اینکوبه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با نیروی ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آبی را به یک تیوب RNase Free جدید منتقل نموده، به ازای هر ۱ میلی‌لیتر تریزول اولیه ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. محتوی لوله‌ها را به خوبی مخلوط نموده، در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده سپس به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (بیشتر نباشد) در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پلاک RNA را یک‌بار با حداقل ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به ازای هر ۱ میلی‌لیتر تریزول اولیه (سمپل به طور کامل با دست یا ورتکس مخلوط گردد) با نیروی ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جهت شست‌وشو سانتریفیوژ گردید. سپس بدون اینکه پلات RNA حل شود، مایع رویی تا جایی که امکان داشت خالی گردید، پلات RNA را در داخل میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده، قبل از اینکه به طور کامل خشک شود. (خشک شدن کامل پلات RNA می‌تواند سبب کاهش حلالیت آن گردد)، RNA را در آب RNase Free (به طور مثال ۲۰ میکرولیتر) به وسیله پر و خالی کردن آن با پی‌پت حل شد. در پایان میکروتیوب حاوی RNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. RNA در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی بیان ژن لپتین و گیرنده‌های آن به روش RT-PCR سنتز cDNA از RNA

با استفاده از کیت cDNA سازی خریداری شده از شرکت فرمنتاز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت از cDNA، RNA ساخته شد.

به طور خلاصه، ابتدا Random Hexamer به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شد. در مواردی که غلظت RNA پایین باشد، آب استفاده نمی‌شود به جای آب، ۹ میکرولیتر RNA استفاده می‌گردد (مقدار مورد نیاز RNA برای سنتز cDNA، ۲-۱میکروگرم می‌باشد).

سپس Master Mix به نسبت زیر تهیه گردید:

2µl dNTP + 1µl RNAse inhibitor + 1µl Reverse Transcriptase + 4µl 5x Buffer

به جز موارد استثناء ۹ میکرولیتر از Random Hexamer رقیق شده را در یک میکروتیوب ریخته و ۲ میکرولیتر RNA به آن اضافه گردید، میکروتیوب را ۳ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد اینکوبه نموده، سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شد، Master Mix را به آن اضافه نموده و مخلوط گردید و ۱۵ تا ۳۰ ثانیه Spin شد، ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد، سپس به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای پایان دادن به واکنش میکروتیوب به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد یا به مدت ۵ دقیقه در ۹۹ درجه سانتی گراد قرارداده شد. cDNA در دمای ۲۰- نگهداری می‌شود.

PCR

بیان ژن‌های لپتین و گیرنده‌های نوع بلند و کوتاه لپتین با پرایمرهای اختصاصی زیر و شرایط ذکر شده در (جدول ۱) با روش PCR بررسی شد.

پرایمرهای لپتین:

Forward : 5'- GAC TTC TAT TCC TGG GCT CCA CC -3'
Reverse : 5' - CCT GAA GCT TCC AGG ACA CC -3'

پرایمرهای گیرنده نوع بلند (long OB-R):

Forward : 5'- CCA GAA ACG TTT GAG CAT CT -3'
Reverse : 5'- CAA AAG CAC ACC ACT CTC TC -3'

پرایمرهای گیرنده نوع کوتاه (short OB-R):

Forward : 5'- GAC TCG TTG TGC AGT GTT CAG -3'
Reverse : 5'- TGG CAC ATT GGG TTC ATC-3'

پرایمرهای بتا اکتین (β-Actin) (کنترل داخلی):

Forward : 5'- CTGGCCGGGACCTGACTGA-3'
Reverse : 5'- TCA GGC AGC TCG TAG CTC TTC-3'

جدول ۱: شرایط و اندازه محصولات PCR

Gene	Anealing tempretuare	Number of cycles	size of target bands
Leptin	61°C	35	(235 bp)
Long OB-R	55°C	35	(609 bp)
Short OB-R	59°C	35	(720 bp)
GAPDH	57°C	35	(224 bp)
β-Actin	59°C	35	(190 bp)

اندازه گیری میزان لپتین

برای مقایسه میزان لپتین پلاسمای افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما و ALL، نمونه خون محیطی سه بیمارمایلومایی و دو فرد ALL-B با سانتریفیوژ با نیروی ۱۸۰۰ دور جدا شد و میزان لپتین آن به روش الیزا با کیت Biovender اندازه‌گیری شد. هم‌چنین محتویات فلاسک‌های حاوی رده‌های سلولی مایلومایی U266 و لنفوییدی RPMI 8866 در فاز لگاریتمی در شرایط استریل را به لوله فالکون انتقال داده با دور ۱۲۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد سپس مایع رویی (Condition Media; CM) را جمع‌آوری نموده، میزان لپتین آن به روش الایزا با کیت Biovender اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر لپتین بر رشد رده‌های سلولی

رده‌های سلولی Jurkat 8866، RPMI و U266، به تعداد ۲۰۰۰۰ میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای در محیط کشت RPMI، FBS ۲ درصد، Co_2 ۵ درصد، ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور و عدم حضور لپتین تجارتی نوترکیب انسانی خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich با غلظت‌های مختلف کشت داده شدند و تعداد آنها هر روز شمارش شد. قبل از بررسی اثر لپتین برروی رده‌های سلولی در پلیت، Viability سلول‌ها با تریپان‌بلوی ۰/۴ درصد در بافر نمکی فسفات، بررسی شد که طی آن سلول‌ها ۱۰۰درصد زنده بودند.

یافته ها

بیان لپتین و گیرنده‌های آن

جهت بررسی بیان لپتین و گیرنده‌های آن در نمونه‌ها شامل رده‌های سلولی و سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان و خون بیماران و افراد نرمال، پس از تهیه cDNA از RNA استخراج شده از سلول‌های هر نمونه، با پرایمرهای اختصاصی لپتین و گیرنده‌های نوع بلند و کوتاه آن و پرایمرهای β-Actin و یا (GAPDH کنترل داخلی)که سکانس آنها در بخش مواد و روش‌ها ذکر شده است، در دستگاه ترموسایکلر، PCR انجام شد و پس از الکتروفورز محصولات PCR و عکس‌برداری از ژل‌ها با دستگاه Gel Digital Documentation نتایج به شرح زیر بود:

بیان لپتین و گیرنده‌های آن دررده‌های سلولی

در رده‌های سلولی مورد مطالعه:

U266 (Myeloma), RPMI 8866 (B-Lymphoid Blastoma), U937 (Histiocyti lymphoma), Jurkat (T cell-Leukemia)

لپتین و گیرنده‌های نوع بلند و کوتاه آن، بیان گردید.

هم‌چنین β-Actin و یا GAPDH تمام cDNAهای ساخته شده مثبت بود (شکل ۳).

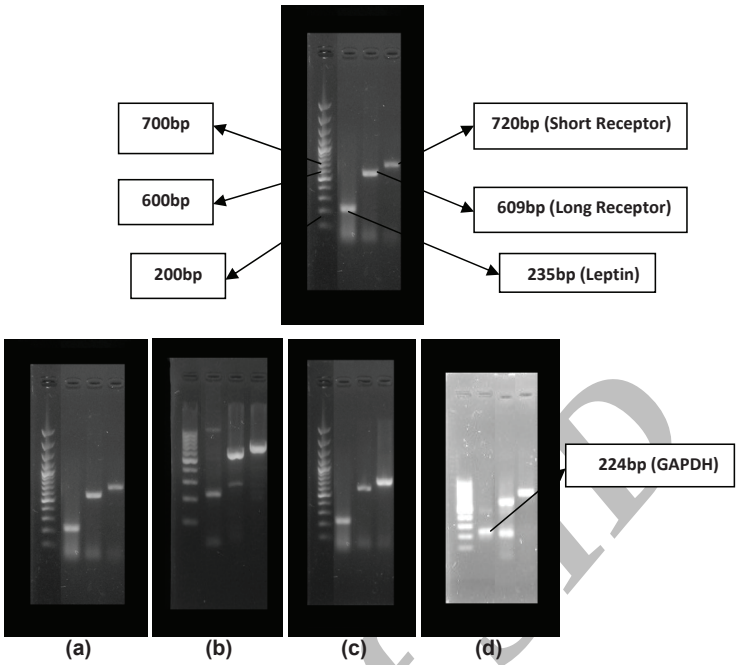
بیان لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما

سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان پنج بیمار مایلومایی و هم‌چنین سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی یک بیمار مایلومایی لپتین و هر دو نوع گیرنده لپتین را بیان نمودند (شکل ۴).

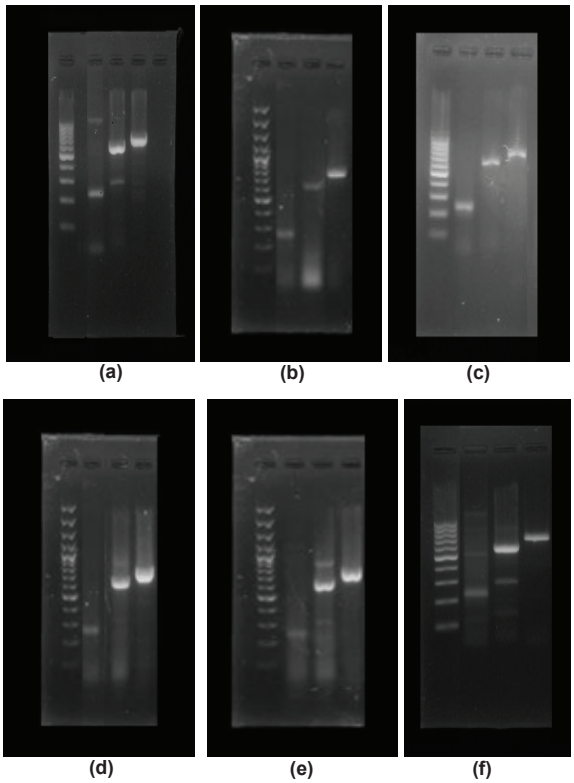
بیان لپتین و گیرنده‌های آن درسلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان بیماران مایلومایی درمان شده و مقایسه آن با فرد مایلومایی درمان نشده

بیماران مایلومایی تحت درمان با تالیدومایید و کورتیکواستروییدها لپتین را بیان نکردند و بیان متفاوتی از گیرنده‌ها را نشان دادند؛ به این معنا که یا هر دو نوع گیرنده، یا هیچ‌کدام ویا تنها یک نوع گیرنده را بیان نمودند (شکل ۵).

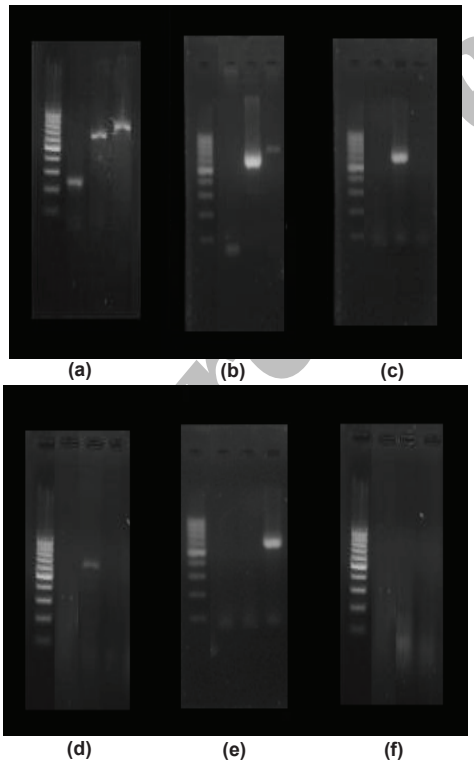
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در رده‌های سلولی
(a: U266، b: RPMI 8866، c: Jurkat، d: U937).



شکل ۴: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما. (a, b, c, d, e): سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان پنج بیمار مایلومایی. (f): سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی یک بیمار مایلومایی.

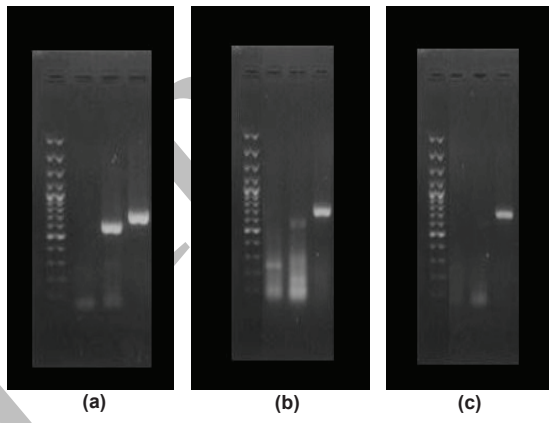


شکل ۵: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان افرد مایلومایی درمان شده و مقایسه آن با فرد مایلومایی تازه تشخیص داده شده. a: سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان بیمار مایلومایی، b: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار مالتیپل مایلومای درمان شده و مشکوک به عود، c, d, e, f: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیماران مالتیپل مایلومای درمان شده.

www.SID.ir

بیان لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان دو فرد B-ALL درمان نشده و یک فرد AML درمان شده

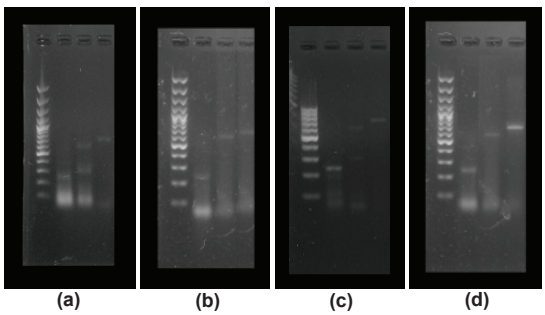
تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار pre B-ALL با شمارش ۹۶ درصد بلاست، لپتین و گیرنده نوع بلند را بیان نکردند و تنها گیرنده نوع کوتاه را بیان نمودند. تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار B-ALL با شمارش ۳۵ درصد بلاست، لپتین و هر دو نوع گیرنده لپتین را بیان نمودند و تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار AML درمان شده لپتین را بیان نکردند ولی هر دو نوع گیرنده را بیان نمودند (شکل ۶).



شکل ۶: بیان لپتین و گیرنده‌های آن درسلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان دو فرد B-ALL و یک فرد AML درمان شده. a: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار pre B-ALL با شمارش ۹۶ درصد بلاست. b: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار B-ALL با شمارش ۳۵ درصد بلاست c: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار AML درمان شده.

بیان لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و مغز استخوان افراد نرمال

تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد نرمال، لپتین و هر دو نوع گیرنده لپتین را بیان نمودند (شکل ۷).



شکل ۷: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان و خون محیطی فرد نرمال. a و b: تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی دو فرد نرمال لپتین و هر دو نوع گیرنده لپتین را بیان می‌کنند. c و d: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان دوفردنرمال لپتین و هر دو نوع گیرنده لپتین را بیان می‌کنند.

میزان لپتین پلاسما

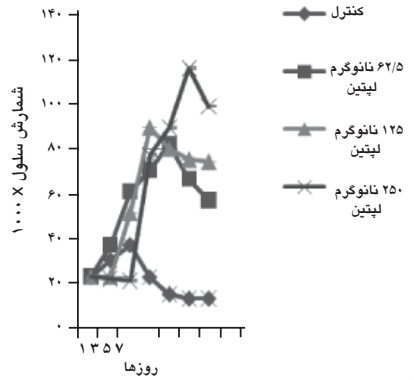
میزان لپتین پلاسمای خون محیطی بیماران مایلومایی بیشتر از بیماران B-ALL بوده و در CM رده‌های سلولی مایلومایی U266 و لنفوییدی RPMI8866 میزان لپتین با روش الایزا صفر بوده است (جدول ۲).

جدول ۲: مقدار لپتین پلاسمای نمونه‌ها

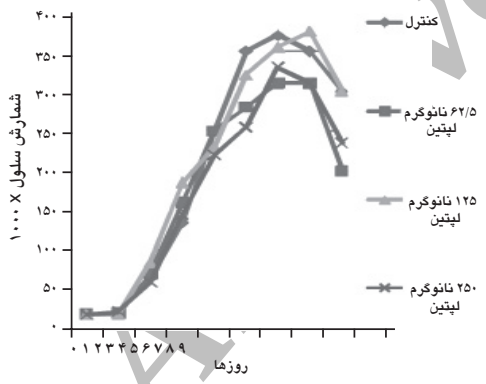
نمونه	MM	MM	MM	ALL	ALL	U266	RPMI 8866
مقدارلپتین برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر	۳/۷	۳/۹	۲/۴	۰/۸	۰/۱	۰	۰

اثر لپتین بر رشد رده‌های سلولی

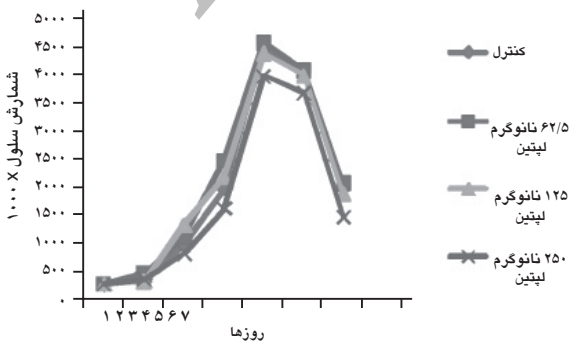
لپتین بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی لنفوییدی نوع B (RPMI8866) وابسته به دوز موثر بود (نمودار ۱) اما بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی مایلومایی U266 (نمودار ۲) و رده سلولی لنفوییدی نوع (T Jurkat) (نمودار ۳) اثری نداشت.



نمودار ۱: اثر لپتین بر رشد سلول‌های RPMI8866



نمودار ۲: اثر لپتین بر رشد سلول‌های U266



نمودار ۳: اثر لپتین بر رشد سلول‌های Jurkat

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در این تحقیق نشان داده شد که لپتین و گیرنده‌های آن توسط تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان افراد مایلومایی و رده سلولی مایلومایی U266، لنفوییدی نوع (B RPMI8866)، لنفوییدی نوع T (Jur-kat) و لنفومای هیستیوسیتی U937 بیان می‌گردد. بنابراین ممکن است لپتین در لوکمیا نقش داشته باشد. به این دلیل که منوکلیارهای مغز استخوان افراد مایلومایی درمان شده مورد مطالعه لپتین را بیان نکردند و بیان متفاوتی از گیرنده‌ها را نشان دادند؛ به این مفهوم که بعضی هر دو نوع گیرنده، برخی هیچ‌کدام از گیرنده‌ها، بعضی تنها گیرنده نوع بلند و بعضی تنها گیرنده نوع کوتاه را بیان نمودند. شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که تالیدومايد (Thalidomide) هم‌چنان که از بر هم‌کنش بین سلول‌های مایلومایی و استرومایی ممانعت نموده، تولید سایتوکاین‌هایی مانند TNF-α و IL-6 را مهار می‌کند و بر بیان لپتین و گیرنده‌های آن نیز اثر مهاری دارد و به دلیل شرکت لپتین در رگ‌سازی ممکن است بخشی از اثر ممانعتی تالیدومايد در رگ‌سازی مربوط به مهار لپتین باشد.

یکی ازنمونه‌های مورد مطالعه، پلاسماسل لوکمیا و دارای ۲۰ درصد پلاسما سل در خون محیطی بود؛ بررسی بیان لپتین و گیرنده‌های آن بر روی تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی این بیمار انجام گرفت. نتایج بیان لپتین و گیرنده‌های آن در تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی این بیمار نشان داده شد. از مقایسه شدت رنگ باندهای لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی این مورد پلاسماسل لوکمیا و تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی فرد نرمال، دیده می‌شود که شدت رنگ این باندها در فرد نرمال بسیار ضعیف‌تر است و اینکه یک مطالعه میزان بیان لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی افراد نرمال توسط Real Time-PCR را بسیار پایین نشان داده است (۳۴) شاید بتوان نتیجه گرفت که سلول‌های مایلومایی لپتین و گیرنده‌هایش را بیان می‌کنند. بنابراین در مغز استخوان احتمال بیان لپتین و گیرنده‌هایش هم توسط سلول‌های مایلومایی و هم ریزمحیط مغز استخوان وجود دارد. احتمال موفقیت در جدا کردن پلاسماسل‌ها از مغز استخوان افراد نرمال به دلیل تعداد بسیار کم آن (۴-۱ درصد) و مقایسه مستقیم میزان بیان لپتین و گیرنده‌هایش در پلاسماسل‌های افراد نرمال و مایلومایی با ستون ماکس کم است.

در این مطالعه نتایج بیان لپتین و گیرنده‌هایش و هم‌چنین کاهش میزان سرمی لپتین در دو بیمار B-ALL متناسب با نتایج مطالعات قبلی است (۳۵، ۳۶). درتک‌هسته‌ای‌های فرد B-ALL pre با شمارش۹۶درصد بلاست، لپتین و گیرنده نوع بلند بیان نمی‌شوند. بنابراین بلاست‌های B-ALL لپتین و گیرنده نوع بلند را بیان نمی‌کنند. در فرد B-ALL با شمارش ۳۵درصد بلاست، بیان لپتین و گیرنده آن مربوط به سلول‌های دیگر غیربلاست می‌باشد. در یک مطالعه دلیل عدم بیان لپتین و گیرنده آن توسط بلاست‌های B-ALL و کاهش میزان سرمی لپتین در بیماران B-ALL تغییرات ایمنی و سایتوکاینی در این بیماران ذکر شده است (۳۵) اما دلیل قطعی آن هنوز معلوم نیست. در بیماران مایلومایی افزایش میزان سرمی لپتین در این مطالعه و مطالعات قبلی نشان داده شده است (۳۹-۳۷).

لپتین بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی لنفوییدی نوع B (RPMI8866) وابسته به دوز موثر بوده اما بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی مایلومایی U266 اثری نداشته است. به دلیل اینکه در ایران تنها رده سلولی مایلومایی موجود U266 می‌باشد، مطالعه اثر لپتین بر رده‌های سلولی دیگر مایلومایی امکان‌پذیر نبود. عدم اثر لپتین بر رشد رده سلولی مایلومایی U266 بر خلاف بیان گیرنده‌های نوع بلند و کوتاه لپتین در این رده سلولی شاید به دلیل ترشح IL-6 توسط رده سلولی مایلومایی U266 و اثر اتوکرین این اینترلوکین بر رشد آن (۴۰) باشد. هم‌چنان که در این مطالعه پس از اضافه نمودن لپتین نوترکیب به محیط کشت سلول‌های Jurkat (T cell-Leukemia)، این رده سلولی گیرنده‌های لپتین را بیان می‌کند، منحنی رشد آنها با کنترل تفاوتی نداشته است که شاید به دلیل ترشح IL-2 توسط این سلول‌ها و اثر اتوکرین این اینترلوکین بر رشد آنها باشد. شاید دلیل دیگر عدم تاثیر لپتین بر رشد این رده‌های سلولی شاید نیاز به هم کشتی آنها با سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان باشد.در یک مطالعه دیگر ذکر شده است که اثر آنتی‌اپوپتیک لپتین بر روی سلول‌های بیان کننده PML-RARα در APL نیاز به Cell-to-Cell Contact دارد و این اثر با افزودن لپتین به محیط کشت، بدون حضور آدیپوسیت‌ها اعمال نمی‌شود (۴۱).

بیان لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیماران مایلومایی و تغییر بیان آنها پس از درمان در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شده است. علت تفاوت بیان لپتین و گیرنده‌هایش و هم‌چنین تفاوت میزان سرمی لپتین در بیماران مایلومایی و B-ALL شاید نقش لپتین در پاتوفیزیولوژی سلول‌های مایلومایی باشد.

به دلیل اینکه:

۱. این مطالعه و چند مطالعه دیگر افزایش مقادیر سرمی لپتین را در بیماران مالتیپل مایلوما نشان داده است (۳۹-۳۷).

۲. مالتیپل مایلوما بیماری است که به طور عمده افراد مسن را درگیر می‌کند، محتوی چربی در ریز محیط مغز استخوان با افزایش سن افزایش می‌یابد و آدیپوسیت‌ها منبع ترشح لپتین هستند (۳۹).

۳. احتمال ارتباط بین افزایش وزن و ریسک ابتلا به مالتیپل مایلوما (۳۷، ۴۲).

۴. شباهت ساختار سوم لپتین به ساختار سوم اعضای خانواده سایتوکاینی با زنجیره بلند مارپیچی مانند:

CT-1, LIF, CNTF, OSM IL-12, IL-11, IL-6 (۴۳).

۵. شباهت ساختمانی گیرنده لپتین به جزء انتقال دهنده سیگنال گیرنده IL-6 (gp-130) وتوانایی لپتین در فعال کردن راه‌های انتقال سیگنال مختلف که مهم‌ترین آنها Ras/MAPK، JAK2/STAT3 و PI3K/ Akt می‌باشد (۴۳).

۶. نتایج آزمایشات کلینیکی اولیه با آنتی بادی‌های ممانعت کننده IL-6 در درمان بیماران مالتیپل مایلوما ناامیدکننده بوده و نتایج کلینیکی قابل توجهی برای آنها شرح داده نشده است (۱۴).

۷. زنده ماندن سلول‌های مایلومایی که گیرنده IL-6 آنها بلوکه شده است، در هم کشتی با سلول‌های استرومای مغز استخوان و در نتیجه نقش شبکه سایتوکاینی در بقا و رشد سلول‌های مایلومایی به جای یک سایتوکاین خاص (IL-6) (۱۰).

۸. این مطالعه بیان لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیماران مایلومایی و تغییر بیان آنها را پس از درمان نشان داده است.

۹. نقش لپتین در تحریک رگ‌سازی (۲۱).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

لپتین می‌تواند هم به طور غیرمستقیم از طریق تحریک رگ‌سازی، رشد سلول‌های مایلومایی را افزایش دهد و هم به طور مستقیم یکی از فاکتورهای رشدی باشد که ریز محیط مغز استخوان را برای رشد سلول‌های مایلومایی فراهم می‌سازد. بنابراین شاید لپتین و گیرنده‌هایش را بتوان به عنوان یک هدف درمانی به همراه هدف‌های درمانی دیگر در مالتیپل مایلوما مورد بررسی قرار داد. اما مطالعه‌ای جامع در مورد راه‌های انتقال سیگنال مختلف فعال شده در ریزمحیط مغز استخوان مایلومایی توسط شبکه سایتوکاینی و درک چگونگی ارتباط آنها با یکدیگر، برای یافتن راه‌های درمانی موثرتر لازم است.

چندین مطالعه نشان داده است که لپتین در استخوان‌سازی نقش دارد (۳۲-۲۹). از آنجا که برخی مطالعات میزان سرمی لپتین افراد مایلومایی را بالا نشان داده است (۳۸-۳۶)؛ ممکن است این افزایش با ضایعات لیتیک استخوانی در این بیماران در ارتباط باشد. بررسی چگونگی این ارتباط می‌تواند موضوع مطالعات بعدی نیز باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های مربوط به این طرح تحقیقاتی توسط معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تامین گردیده است. لذا نویسندگان از همکاری این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Kyle RA. Diagnostic criteria of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am. 1992; 6(2): 347-358.
2. Hideshima T, Nergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood. 2004; 104(3): 607-618.
3. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. J Clin Oncol. 2005; 23(26): 6333-6338.
4. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. Cancer Res. 2004; 64(4): 1546-1558.
5. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. Cancer Res. 2004; 64(4): 1546-1558.
6. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood. 2004; 104: 607-618.
7. Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. Best Pract Res Clin Haematol. 2005; 18(4): 509-524.
8. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J , Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity. 1999; 10: 105-115.
9. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. Nature. 1988; 332: 83-85.
10. Chatterjee M, Stuhmer T, Herrmann P, Bommert K, Dorken B, Bargou RC. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. Blood. 2004; 104: 3712-3721.
11. Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, Weber D, Alexanian R, Raj-Vadhan S, et al. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. Blood. 2004; 103: 3175-3184.
12. Hilbert DM, Kopf M, MockBA, Kohler G, Rudikoff S. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. J Exp Med. 1995; 182: 243-248.
13. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted antiinterleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. Clin Cancer Res. 2003; 9: 4653-4665.
14. Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, Bommert K, Gollasch H, Dörken B, et al. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. Leukaemia. 2004; 18: 1883-1890.
15. Tai YT, Podar K, Catley L, Tseng YH, Akiyama M, Shringarpure R, et al. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. Cancer Res. 2003; 63: 5850-5858.
16. Klein B, Tarte K, Jourdan M, Mathouk K, Moreaux J, Jourdan E, et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. Int J Hematol. 2003; 78: 106-113.
17. Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. Signaling and survival pathways in multiple myeloma. Eur J Cancer. 2006; 42: 1574-1580.
18. Kim KH, Kim YJ, Lee S, Oh SW, Lee K, Park Y, Kim HJ, Kwak H. Evaluation of plasma leptin levels & BMI as predictor of postpartum weight retention. India J Med Res. 2008; 128(5): 595-600.
19. Bates SH, Myers MG Jr. The role of leptin receptor signaling in Feeding and neuroendocrine function. Trends Endocrinol Metab. 2003; 14(10): 447-452.
20. Mantzoros CS. Role of Leptin in Reproduction. Ann N Y Acad Sci. 2000; 900:174-83.
21. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the Product of Ob Gene, promotes angiogenesis. Circ Res 1998; 83: 1059-1066.
22. Lago R, Gómez R, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O.Leptin beyond body weight regulation--current concepts concerning its role in immune function and inflammation. Cell Immunol. 2008; 252(1-2): 139-45.
23. Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. Cell Mol Immunol. 2007; 4(1): 1-13.
24. La Cava A, Matarese G. The Weight of Leptin in Immunity. Nat Rev Immunol 2004; 4: 371-379.
25. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(25): 14564-14568.
26. Gainsford T, Alexander WS: A Role for Leptin in hemopoieses? Mol Biotechnol. 1999; 11: 149-158.
27. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis Curr Biol. 1996; 6(9): 1170-1180.
28. Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riv-

Archive of SID
www.SID.ir

eros J, Sierra-Honigmann MR.Leptin is an autocrine/ paracrine regulator of wound healing. FASEB J. 2003; 17(13): 1895-1897.
29. Astudillo P, Rios S, Pastenes L, Pino AM, Rodriguez JP. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. J Cell Biochem. 2008; 103: 1054-1065.
30. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. Cell Metab. 2006; 4: 341-348.
31. Heep H, Wedemeyer C, Wegner A, Hofmeister S, von Knoch M. Differences in trabecular bone of leptin-deficient ob/ob mice in response to biomechanical loading. Int J Biol Sci. 2008; 4(3):169-175.
32. Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, et al. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. J Biol Chem. 2003; 278(24): 21920-21929.
33. Ren J. Leptin and hyperleptinemia-from friend to foe for cardiovascular function. J Endocrinol. 2004; 181: 1-10.
34. Samara A, Marie B, Pfister M, Visvikis-Siest S. Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability. Clin Chim Acta. 2008; 395(1-2): 47-50.
35.Wex H, Ponelis E, Wex T, Dressendörfer R, Mittler U, Vorwerk P. Plasma leptin and leptin receptor expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Int J Hematol. 2002; 76(5): 446-452.
36. Nakao T, Hino M, Yamane T, Nishizawa Y, Morii H, Tatsumi N: Expression of the leptin receptor in human leukaemic blast cells. Br J Haematol. 1998; 102: 740-745.
37. Dalamaga M, Karmaniolas K, Panagiotou A, Hsi A, Chamberland J, Dimas C, et al. Low circulating adiponectin and resistin, but not leptin, levels are associated multiple myeloma risk: a case control study. Cancer Causes Control. 2009; 20(2): 193-199.
38. Pamuk GE, Demir M, Harmandar F, Yesil Y, Turgut B, Vural O. Leptin and resistin leveles in serum of patients With hematologic malignancies: correlation with clinical characteristics. Exp Oncol. 2006; 28(3): 241-244.
39. Reseland JE, Reppe S, Olstad OK, Hjorth-Hansen H, Brenne AT, Syversen U, et al. Abnormal adipokine levels and leptin-induced changes in gene expression profiles in multiple myeloma. Eur J Haematol. 2009; 83: 460-470.
40. Schwab G, Siegall CB, Aarden LA, Neckers LM, Nordan RP. Characterization of an interleukin-6-mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line, U266. Blood. 1991; 77(3): 587-593.
41. Tabe Y, Konopleva M, Munsell MF, Marini FC, Zompetta C, McQueen T, et al. PML-RAR {alpha} is associated with leptin-Receptore induction: the role of mesenchymal stem cell-drived adipoctes in APL cell survival. Blood. 2004; 103: 1815-1822.
42. Larsson SC, Wolk A. Body mass index and risk of multiple myeloma: A meta- analysis. Int. J Cancer. 2007; 121: 2512-2516.
43. Fruhbeck G. Intracellular signaling pathways activated by by leptin. Biochem J. 2006; 393(Pt 1): 7-20.

Archive of SID

www.SID.ir