

مهار بیان ژن نوکلئوستمین به واسطه siRNA باعث مهار رشد، توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز در رده سلولی K562 لوسمی انسانی می شود

سید محمد امین موسوی^{۱*}، نگین سیدگوگانی^۲، ایرج اسودی کرمانی^۳، مسعود اسدی^۴

- ۱- استادیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۳- استاد، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۴- دکترای فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: نوکلئوستمین نقش عمده‌ای در کنترل رشد و خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی ایفا می‌کند. بنابراین مهار بیان نوکلئوستمین می‌تواند به عنوان عامل بالقوه در درمان سرطان محسوب شود. در مطالعه حاضر، اثرات سرکوب بیان ژن نوکلئوستمین در رده سلولی K562 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پس از تیمار سلول‌های K562 با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین، تغییر در الگوی بیان نوکلئوستمین با واکنش رونویسی معکوس نیمه کمی بررسی گردید. آزمون دفع رنگ تریپان بلو و آزمون جذب نمک تترازولیوم و میکروسکوپ فلورسنت به ترتیب به منظور بررسی مهار رشد و مرگ سلولی سلول‌های K562 به کار گرفته شد. از فلوسایتومتری برای بررسی اثرات مهار ژن نوکلئوستمین بر چرخه سلولی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ژن نوکلئوستمین بیان بالایی در سلول‌های K562 دارد. تیمار سلول‌های K562 با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین در غلظت ۲۰۰ نانومولار پس از ۴۸ ساعت، سطح mRNA نوکلئوستمین را در مقایسه با سلول‌های کنترل به میزان ۵۵ درصد مهار کرد. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، رشد سلول‌ها به میزان ۳۳/۷ درصد کاهش یافت. همچنین مهار بیان ژن نوکلئوستمین منجر به مهار چرخه سلولی در مرحله G₁ شد. نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که آپوپتوز، ۴۸ ساعت پس از خاموشی بیان ژن نوکلئوستمین رخ می‌دهد.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات قوی مهار رشدی و آپوپتوزی siRNA نوکلئوستمین در سلول‌های K562 لوسمی میلوئید انسانی، خاموشی بیان این ژن می‌تواند به عنوان یک هدف بالقوه در مهار سلول‌های K562، به عنوان مدل سلول بنیادی لوسمی میلوئیدی مزمن باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، لوسمی میلوئیدی مزمن، نوکلئوستمین، siRNA

*نویسنده مسئول: آذربایجان شرقی، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری

Email: moosav_m@tabrizu.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی بر اساس مدل سلول بنیادی سرطان به عنوان منشأ انواع مختلف سرطان‌های انسانی معرفی شده‌اند (۱). سلول‌های بنیادی سرطانی زیر مجموعه کوچکی از سلول‌های سرطانی هستند که خصوصیات مشابه با سلول‌های بنیادی داشته و دارای توانایی خودنوزایی (Self-renewal) می‌باشند (۲). اختلال در عملکرد ژن‌هایی که در تنظیم فرایند خودنوزایی سلول‌های بنیادی دخیل می‌باشند، منجر به تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و تشکیل تومور می‌شود (۳). لذا مشکل عمده در درمان سرطان حذف این سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشد و بر اساس نظریه جدید، کلیه روش‌های درمانی بر روی حذف این سلول‌ها و از کار انداختن خودنوزایی آنها تمرکز نموده است. تاکنون ژن‌های مختلفی در ارتباط با پدیده خودنوزایی در سلول‌های بنیادی و سلول‌های سرطانی مورد بررسی‌های فراوانی قرار گرفته‌اند. یکی از این ژن‌ها که به تازگی در کانون توجه قرار گرفته است، ژن نوکلئوستمین (Nucleostemin-Ns) می‌باشد که توسط تی‌سای و همکاران در سال ۲۰۰۲ میلادی در سلول‌های بنیادی سیستم عصبی موش صحرایی کشف شد و به دلیل جایگاه هسته‌ای و بیان آن در سلول‌های بنیادی به این نام نامیده شد (۴). پروتئین نوکلئوستمین که در هستک سلول متمرکز است از طریق اتصال به گوانوزین تری فسفات (GTP) و هیدرولیز آن، بین هستک و شیره هسته در تعادل دینامیک می‌باشد (۵). نوکلئوستمین با ورود به شیره هسته و میان کنش با پروتئین سرکوب‌گر تومور به نام p53 به طور مستقیم یا غیر مستقیم از عملکرد مهار چرخه سلولی p53 جلوگیری می‌کند (۷). همان‌طور که می‌دانیم پروتئین p53 یک تنظیم‌کننده کلیدی رشد سلول و محافظ ژنوم است که در کنترل چرخه سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش دارد (۸). مطالعات جامع‌تر نشان دادند که نوکلئوستمین یک مارکر سلول بنیادی نیز محسوب می‌شود که به میزان بالایی در انواع مختلف سلول‌های بنیادی و برخی رده‌های سلولی سرطانی و بافت‌های سرطانی بیان می‌شود (۹-۱۱). این در حالی است که بیان این ژن در حین تمایز سلول‌های بنیادی و نیز در سلول‌های تمایز یافته متوقف می‌شود که

نشان دهنده نقش عمده نوکلئوستمین در حفظ خودنوزایی سلول‌های بنیادی و سرطانی است (۱۱، ۱۲). مطالعات متعددی در زمینه مهار عملکردی ژن نوکلئوستمین با استفاده از استراتژی RNAi (RNA interference) انجام یافته است که منجر به اثرات مهاری رشد، آپوپتوز و تمایز در برخی رده‌های سلولی شده است (۱۹-۱۳). با این حال هیچ مطالعه جامعی در رابطه با نقش این ژن در سرطان خون به خصوص لوسمی میلوئیدی مزمن انجام نشده است.

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML-Chronic myeloid leukemia) یک بیماری کلونال با منشأ سلول‌های بنیادی است که در اثر ناهنجاری ژنتیکی از نوع جابه‌جایی کروموزومی بین ژن *abl* بر روی کروموزوم ۹ و ژن *bcr* بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خون ساز چندتوان ایجاد می‌شود (۲۰). انکوژن *Bcr-Abl* حاصل از این جابه‌جایی، پروتئین $p210^{Bcr-Abl}$ را کد می‌کند که منجر به تکثیر بی‌رویه و مستقل از عامل رشد سلول‌های پیش ساز میلوئید و نیز اختلال در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) می‌شود (۲۱). پیشرفت‌های زیادی در روش‌های درمانی این بیماری وجود دارد. به عنوان مثال در سال‌های اخیر داروی اختصاصی مهارکننده تیروزین کیناز-*Bcr-Abl*، به نام ایماتینیب مسیلات (*Imatinib mesylate*) و داروهای نسل‌های بعد از آن، جهت درمان پیشنهاد شده است (۲۲). به هر حال استفاده از این مهارکننده‌ها نیز با برخی اثرات جانبی از جمله مقاومت دارویی همراه بوده است (۲۳). این گونه عنوان می‌شود که عدم پاسخ دهی و هدف‌گیری شدن سلول‌های بنیادی لوسمیک در CML عامل اصلی عدم درمان این بیماران است. لذا مطالعات اخیر در زمینه شناخت ژن‌های درگیر در رشد و خودنوزایی سلول‌های لوسمیک در جریان است. مطالعه حاضر، به منظور بررسی بیان ژن نوکلئوستمین و تأثیر مهار این ژن در سلول‌های K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی سرطان خون CML طراحی گردیده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های اریترولوکمیای K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت RPMI-1640 (Biosera، انگلستان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum- (FBS، Biosera، انگلستان) و آنتی بیوتیک‌های استروپتومايسين (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) (سیناژن، تهران) در انکوباتور کشت سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد کشت و نگهداری شد.

طراحی و سنتز siRNA

به منظور خاموشی بیان ژن نوکلئوستمین اولیگوهای دو رشته‌ای ۲۱ نوکلئوتیدی siRNA علیه ژن نوکلئوستمین با استفاده از برنامه انتخاب siRNA (siRNA Target Finder) موجود در سایت اینترنتی Ambion http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html علیه هر سه واریانت mRNA نوکلئوستمین (NM014366، NM206825، NM206826) طراحی

شد و توسط شرکت Eurofins MWG Operon سنتز شد. صحت عملکرد siRNA اختصاصی نوکلئوستمین مورد استفاده در این تحقیق، قبلاً توسط نیک پور و همکاران در مطالعه عملکرد نوکلئوستمین در رده سلولی سرطانی مثانه انسانی به اثبات رسیده است (۱۸). اولیگوها با بافر siMAX بنا به توصیه شرکت سازنده به صورت محلول در آورده شد و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به منظور بررسی کارایی آلوده سازی با ویروس اولیگوهای siRNA در انتهای ۳ با فلورسین

(Fluorescein) نشان‌دار شدند. توالی siRNA سنتز شده

برای نوکلئوستمین به شرح زیر می‌باشد

سنس: 5'-GAACUAAAACAGCAGCAGAdTdT-3'

آنتی سنس:

5'-UCUGCUCUGUUUUAGUUCdTdT-3'

تیمار سلول‌ها با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین

روز قبل از آلوده سازی، ۳×۱۰^۵ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم و آنتی بیوتیک در فلاسک کشت سلول کشت داده شدند. در روز

ترانسفکشن، ۲×۱۰^۵ سلول به ازای هر چاهک از ظرف ۲۴ خانه (SPL life science، کره جنوبی) به همراه ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت RPMI حاوی سرم و آنتی بیوتیک کشت داده شدند. در یک تیوب جداگانه الیگوهای siRNA به میزان ۱۵۰۰ نانوگرم (غلظت ۲۰۰ نانومولار) به ازای هر چاهک، به ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت فاقد سرم اضافه شد. سپس ۶ میکرو لیتر از محلول HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen، آمریکا) به مخلوط بالا افزوده و ورتکس گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در مکان ثابت و دمای اتاق قرار گرفت. پس از گذشت زمان مورد نظر، محلول حاصل به چاهک حاوی سلول منتقل شده و پلیت به آرامی تکان داده شد تا کمپلکس آلوده سازی به طور یکنواخت در چاهک پخش شود. بعد از گذشت ۶ ساعت، ۴۰۰ میکرو لیتر محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک و سرم به هر چاهک اضافه شد.

استخراج RNA و واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR)

استخراج RNA از سلول‌های آلوده شده با siRNA نوکلئوستمین و سلول‌های کنترل، ۱، ۱۲، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلوده سازی، با استفاده از محلول RNX-plus (سیناژن، تهران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مقادیر یکسان از RNA اولیه (۱ میکروگرم) با آنزیم DNaseI تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT (فرمنتاز، کانادا) و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RT (RevertAidTM M-MLV) (فرمنتاز، کانادا) به cDNA تبدیل شدند. به منظور بررسی بیان ژن، واکنش PCR با ۲/۵ میکرو لیتر cDNA به همراه MgCl₂، dNTP، بافر ۱۰x، آنزیم Taq پلیمراز (سیناژن، تهران)، آغازگرهای پایین دست و بالا دست و آب در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. در این تحقیق، ژن β2m به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد. شماره دستیابی ژن‌های تحت مطالعه، توالی پرایمرها و طول محصولات PCR در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته برای تکثیر ژن $\beta 2m$ و نوکلئوستمین

آغازگر $\beta 2m$ (NM004048): قطعه حاصل از PCR، ۱۹۱ جفت باز می‌باشد
آغازگر جلویی 5'-CTACTCTCTCTTTCT GGCCTG-3'
آغازگر برگشتی 5'-GACAAGTCTGAATGCTCCAC-3'
آغازگر نوکلئوستمین (NM014366, NM206825, NM206826): قطعه حاصل از PCR، ۴۱۸ جفت باز می‌باشد.
آغازگر جلویی 5'-AAAGCCATTCCGGTTGGAGT-3'
آغازگر برگشتی 5'-ACCACAGCAGTTTGGCAGCAC-3'

نمک تترازولیوم MTT (Roche، آلمان) به تمامی چاهک ها افزوده شد. پس از ۴ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از بافر حل کننده (Roche، آلمان) برای لیز سلول های موجود و حل کردن کریستال های فورمازان اضافه شد. پس از گذشت یک شب، جذب نوری هر یک از چاهک ها با استفاده از میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید (۲۴).

تجزیه و تحلیل چرخه ی سلولی

جهت بررسی چرخه سلولی و محتوای DNA سلول های تیمار شده از دستگاه فلوسایتومتر استفاده شد. به این منظور سلول ها با غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA در زمان های مختلف تیمار گردیدند. بعد از جمع آوری و شستشو در محلول PBS سرد، سلول ها در اتانول ۷۰ درصد تثبیت شده و تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای بررسی مراحل چرخه سلولی، سلول های کنترل و تیمار شده را به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰ میلی گرم پروپیدیوم ایویدید (Propidium Iodate-PI) و ۲۰ میلی گرم RNase (حل شده در ۱ میلی لیتر PBS) مخلوط کرده و توسط دستگاه فلوسایتومتر (Partec-Pas، آلمان) بررسی گردید. با استفاده از نرم افزار خاص دستگاه، درصد جمعیت سلولی در مراحل G_1 ، S و G_2/M مشخص گردید (۲۵).

در پایان به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی، ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (حاوی 5×10^4 سلول) با ۱ میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (Ao/Et) (سیگما، امریکا) با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن، بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. پس از تهیه اسمیر، تغییرات مورفولوژیکی سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss، آلمان) مشاهده گردید (۲۵).

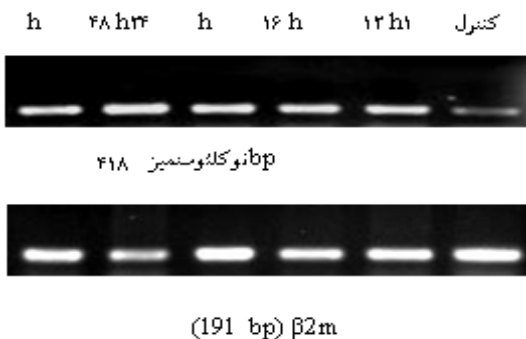
مطالعه ریخت شناسی سلول های K562 پس از مهار بیان ژن نوکلئوستمین

به منظور بررسی اثرات مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر ظاهر سلول های K562، تعداد 10^5 سلول در ظروف ۲۴ چاهکی کشت داده شد. سلول ها با غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA، برای فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت شناسی سلول های تیمار شده با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus، ژاپن) در قیاس با سلول های کنترل تیمار نشده، مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. برای این منظور تعداد 5×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی قرار داده شد. غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار siRNA به سلول ها ترانسفکت شد و در فواصل زمانی ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعداد سلول های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و رنگ تریپان بلو (سیگما، امریکا) مورد شمارش قرار گرفت (۲۴).

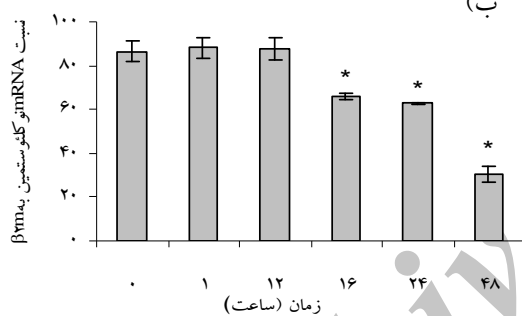
جهت بررسی اثرات مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر میزان مرگ سلولی، آزمون نمک تترازولیوم (MTT) به کار گرفته شد که بر پایه شکسته شدن نمک MTT تترازولیوم زرد به فورمازان کریستالی ارغوانی رنگ توسط سلول های فعال از نظر متابولیکی می باشد. کریستال های فورمازانی که تشکیل می شوند، قابل حل شدن هستند و جذب محلول رنگی حاصل می تواند با استفاده از اسپکتروفوتومترهای چند چاهکی به طور کمی بررسی شود. به این منظور، سوسپانسیون سلولی حاوی 2×10^4 سلول به ازای هر چاهک پلیت ۹۶ تایی کشت داده شد و غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA به سلول ها ترانسفکت شد. پس از گذشت زمان ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۰ میکرولیتر

اندازه گیری مهار بیان نوکلئوستمین در قیاس با ژن $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی صورت گرفت.

(الف)



(ب)

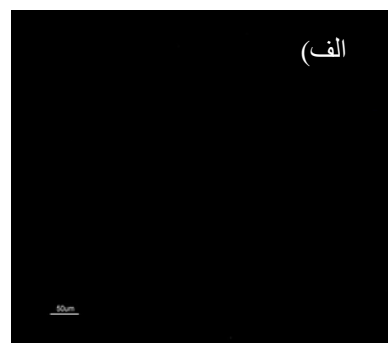
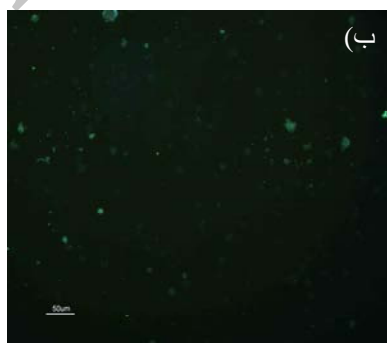


شکل ۱. بررسی الکتروفورزی و نیمه کمی مهار ژن نوکلئوستمین با siRNA در سلول های K562. الف) اثرات NS-siRNA بر میزان بیان mRNA نوکلئوستمین در سلول های K562 در زمان های مختلف به کمک الکتروفورز ژل آگارز و تکنیک RT-PCR. ب) نمودار نسبت mRNA نوکلئوستمین به $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی.

داده های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل می باشد. داده ها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2003، SPSS نسخه ۱۴ و آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده های با ارزش $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی بیان بالای نوکلئوستمین را در سلول های K562 تأیید کرد (شکل ۱- الف). پس از اطمینان از بیش بیان این ژن در رده سلولی K562، سلول ها با غلظت های ۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار siRNA اختصاصی نوکلئوستمین مطابق با مطالعات مشابه آلوده شدند. شکل ۲ انجام صحیح آلوده سازی در این سلول ها را تأیید کرد. پس از بررسی نتایج، غلظت ۲۰۰ نانومولار به عنوان غلظت بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد. تیمار با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین در غلظت ۲۰۰ نانومولار کاهش معنی داری در سطح mRNA نوکلئوستمین نشان داد (جدول ۲). همان طور که در شکل ۱- ب مشاهده می شود، این کاهش ۱۶ ساعت پس از آلوده سازی آغاز شد به طوری که سطح mRNA نوکلئوستمین در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار حدود ۲۰ درصد کاهش یافت. این کاهش در بیان ژن نوکلئوستمین ۴۸ ساعت بعد از تیمار با ۲۰۰ نانومولار siRNA افزایش یافته و سطح mRNA نوکلئوستمین به میزان ۵۵ درصد نسبت به گروه کنترل مهار شد. مقادیر دقیق مربوط به ارزش p در جدول ۲ آمده است. لازم به ذکر است که

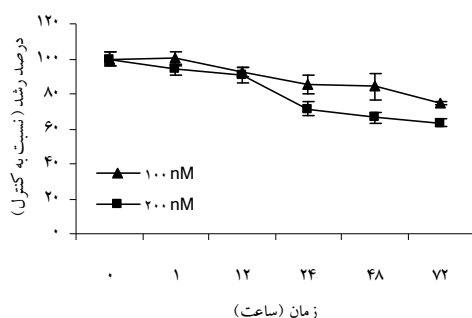


شکل ۲. تصویر آلوده شدن سلول های K562 با siRNA نشاندار. الف) تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول های K562 کنترل بدون تیمار ب) تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول های K562 آلوده شده با siRNA نشان دار با فلورسین

جدول ۲. میزان مهار ژن نوکلئوستمین نسبت به $\beta 2m$

درصد نسبت mRNA نوکلئوستمین به $\beta 2m$ مربوطه						غلظت (نانومولار)
ساعت ۴۸	ساعت ۲۴	ساعت ۱۶	ساعت ۱۲	ساعت ۱	کنترل	۲۰۰
۳۰/۴۶۸۶۱	۶۲/۹۱۴۶۳	۶۵/۷۹۳۰۹	۸۷/۷۲۳۰۸	۸۸/۱۵۲۹۴	۸۶/۳۷۳۴	
$p < 0.001$	$p = 0.008$	$p = 0.002$	$p = 0.08$	$p = 0.07$		

۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۷/۶، ۱۴/۵، ۱۵/۹ و ۲۵/۱ درصد بود. این داده‌ها در جدول ۳ به صورت درصد رشد نسبت به کنترل نشان داده شده‌اند.



شکل ۳. نمودار اثرات مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر روی رشد سلول‌های K562.

پس از مهار بیان ژن نوکلئوستمین، بررسی عملکرد siRNA و اثرات ناشی از خاموشی بیان ژن نوکلئوستمین بر رشد و تکثیر سلول‌ها با آزمون تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۳ منحنی مهار رشد سلول‌ها را در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار siRNA نشان می‌دهد. میزان مهار رشد ۱۲ ساعت پس از آلوده سازی در غلظت ۲۰۰ نانومولار، ۹/۲ درصد بود. آنالیز آماری مربوط به این زمان $p < 0.01$ را نشان می‌دهد که در حد معنی‌داری نمی‌باشد. در حالی که پس از گذشت ۲۴ ساعت، رشد سلول‌های آلوده شده با siRNA نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری به میزان ۲۸/۸ درصد کاهش یافت ($p < 0.003$) و در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت این کاهش در رشد سلول‌ها به ترتیب به ۳۳/۷ و ۳۶/۴ درصد رسید. در غلظت ۱۰۰ نانومولار میزان مهار رشد نسبت به کنترل در زمان‌های

جدول ۳. میزان مهار رشد سلول‌های K562 تحت تأثیر مهار ژن نوکلئوستمین

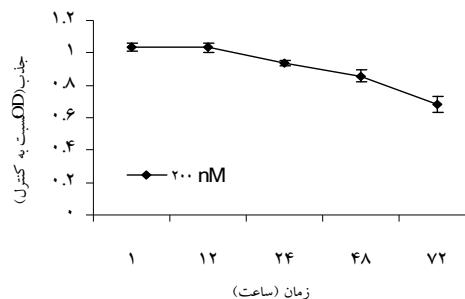
درصد رشد نسبت به کنترل					غلظت (نانومولار)
ساعت ۷۲	ساعت ۴۸	ساعت ۲۴	ساعت ۱۲	ساعت ۱	کنترل
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰ نانومولار
$74/86 \pm 0.75$	$84/08 \pm 7/78$	$85/41 \pm 5/59$	$92/30 \pm 2/43$	$100 \pm 3/64$	
$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.002$	$p < 0.007$	$p < 0.09$	
$63/53 \pm 2/4$	$66/26 \pm 2/8$	$71/19 \pm 4$	$90/73 \pm 4/43$	$93/82 \pm 3/12$	۲۰۰ نانومولار
$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.003$	$p < 0.01$	$p < 0.03$	

بدین مفهوم است که با گذشت زمان میزان سمیت siRNA به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p < 0.01$) و در زمان ۷۲ ساعت جذب نوری سلول‌های تیمار شده به ۰/۶۸ کاهش یافت که بیان‌گر کاهش زیستایی سلول‌ها در پی مهار نوکلئوستمین به میزان ۳۴/۹ درصد می‌باشد. آنالیز آماری در این محدوده زمانی نیز معنی‌دار بوده و $p < 0.0001$ را نشان داد. این یافته در راستای نتایج حاصل از آزمون تریپان بلو می‌باشد که همان‌طور که اشاره شد، میزان مهار رشد در ۷۲ ساعت در غلظت ۲۰۰ نانومولار حدود ۳۶/۴ درصد بود.

نتایج سنجش رنگ MTT با اندازه‌گیری جذب نوری در طول زمان، در شکل ۴ نشان داده شده است. این نتایج تأیید کننده مرگ سلولی ناشی از مهار بیان نوکلئوستمین در زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۲۰۰ نانومولار بود. در غلظت ۲۰۰ نانومولار میزان جذب نوری نسبت به کنترل در ۲۴ ساعت پس از آلوده سازی ۰/۹۳ به دست آمد ($p < 0.01$) که از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد. اما پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت جذب نوری در گروه سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل به ۰/۸۵ رسید. این

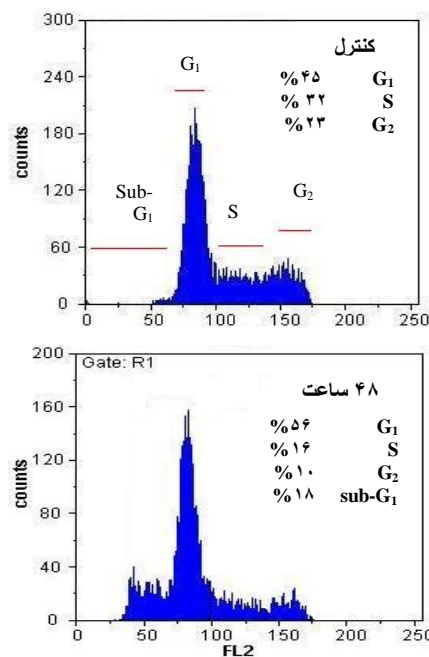
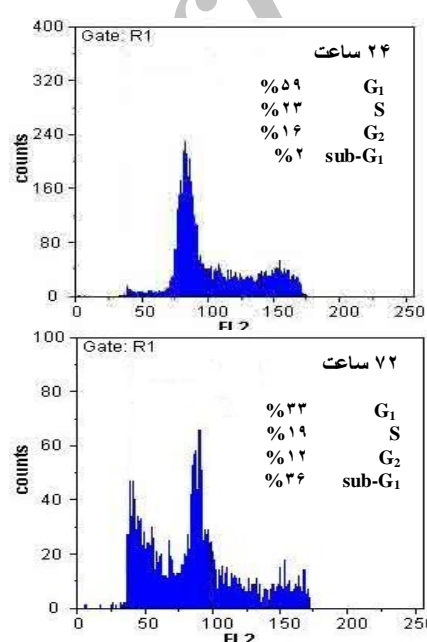
DNA های تکه تکه شده است نیز وقوع آپوپتوز را در زمان ۴۸ ساعت نشان داد. به طوری که تعداد سلول‌ها در این مرحله در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب به ۱۸ و ۳۶ درصد رسید. این نتایج حاکی از کاهش در تعداد سلول‌های موجود در فاز S و G₂، همراه با افزایش در سلول‌های فاز G₁ می‌باشد. نتایج تأیید می‌کند که تیمار سلول‌ها با siRNA نوکلئوستمین باعث مهار رشد سلولی در مرحله G₁ و سپس مرگ سلولی در زمان‌های بالاتر می‌شود.

بررسی تغییرات ظاهری سلول‌های تیمار شده با siRNA نشان دهنده تغییرات ریخت شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، با گذشت زمان تعداد سلول‌ها در گروه سلول‌های آلوده شده نسبت به کنترل کاهش می‌یابد. سلول‌های K562 در حالت طبیعی (گروه کنترل) سلول‌های کروی هستند. مطابق شکل، تغییرات ایجاد شده در اثر مهار بیان نوکلئوستمین در طول زمان شامل گرانولار شدن سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل، خارج شدن سلول‌ها از شکل کروی طبیعی و ایجاد چروکیدگی در غشا می‌باشد، به طوری که ۷۲ ساعت پس از آلوده سازی اجسام آپوپتوتیک قابل تشخیص می‌باشد.

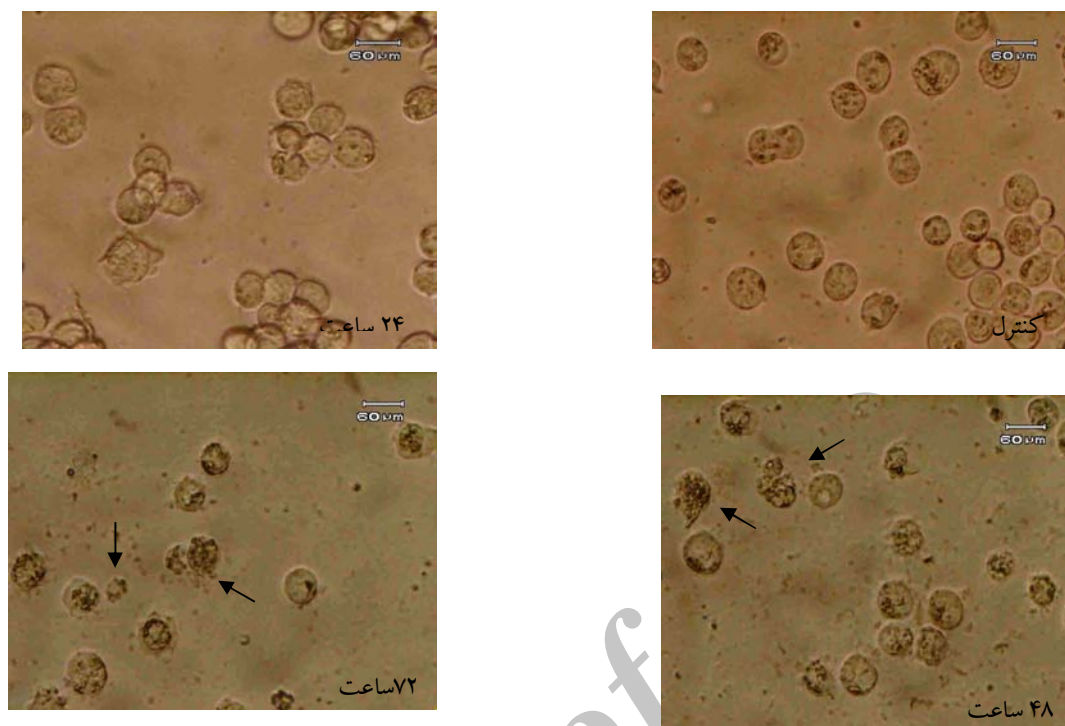


شکل ۴. اثر مهار بیان نوکلئوستمین بر میزان تکثیر سلول‌های K562 به واسطه siRNA

از آنجایی که به طور معمول تغییر و مهار چرخه سلول پیش مقدمه اکثر فرایندها از جمله مهار رشد و مرگ سلولی می‌باشد، لذا بررسی چرخه سلولی نیز انجام گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های تیمار شده با ۲۰۰ نانومولار siRNA در مقایسه با سلول‌های کنترل، با گذشت زمان، توقف در مرحله G₁ چرخه سلولی را نشان می‌دهند (شکل ۵). در گروه کنترل، سلول‌های موجود در هر یک از مراحل G₁، S و G₂ به ترتیب ۴۵، ۳۲ و ۲۳ درصد از جمعیت کل سلولی را تشکیل می‌دهند. در حالی که در سلول‌های آلوده شده با siRNA این مقادیر معادل ۵۹، ۲۳ و ۱۶ درصد در زمان ۲۴ ساعت و ۵۶، ۱۶ و ۱۰ درصد در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد. پیک sub-G₁ که نشان دهنده



شکل ۵. آنالیز چرخه سلولی سلول‌های K562 پس از مهار بیان ژن نوکلئوستمین



شکل ۶. تغییرات ریخت شناسی و ظاهری سلول‌های K562 ترانسفکت شده با siRNA. سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA ترانسفکت شدند و تغییرات ظاهری آنها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با میکروسکوپ نوری (درشت‌نمایی ۴۰×) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که مشهود است با افزایش زمان سلول‌های K562 از حالت کروی خارج شده و تمامیت غشا در آنها از بین می‌رود.

مدت زمان ۴۸ ساعت، تغییرات ریخت شناسی مشابه آپوپتوز قابل رویت می‌باشد. به عبارتی، همان‌طور که در شکل ۷-ب به وضوح دیده می‌شود، سلول‌هایی به رنگ سبز درخشان دیده می‌شوند که حاوی نقاط روشن سبز در هسته هستند که متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند. این سلول‌ها حاکی از سلول‌هایی در مراحل اولیه آپوپتوز هستند. سلول‌هایی که در مراحل نهایی آپوپتوز قرار دارند، رنگ اتیدیوم بروماید را از خود عبور داده و به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. در این سلول‌ها نیز متراکم شدن کروماتین و قطعه‌قطعه شدن هسته به وضوح دیده می‌شود. این نتایج حاکی از القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از نوع آپوپتوز در پی مهار نوکلئوستمین می‌باشد.

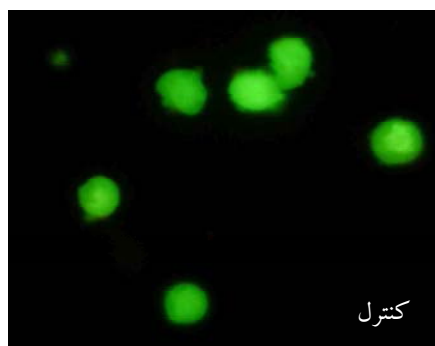
به منظور بررسی دقیق‌تر اثرات ناشی از مهار بیان ژن نوکلئوستمین و بررسی این موضوع که آیا سرکوب بیان نوکلئوستمین سبب القاء مرگ نکروزی می‌شود یا مرگ به طریق آپوپتوز، از روش رنگ آمیزی با Ao/Et و میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT که کاهش زیستایی حاصل از مهار نوکلئوستمین، ۴۸ ساعت پس از آلوده سازی در غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA بر سلول‌ها اعمال می‌شود، لذا بر آن شدیم وقوع مرگ سلولی به واسطه مهار ژن نوکلئوستمین در این رده سلولی را در زمان ۴۸ ساعت و با غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA بررسی کنیم. همان‌طور که در شکل ۷-ب الف مشاهده می‌شود، در گروه کنترل سلول‌های زنده با هسته طبیعی دارای کروماتین سبز درخشان و یکنواخت با ساختار سازمان یافته قابل رویت می‌باشند، در حالی که در گروه سلول‌های آلوده شده با غلظت ۲۰۰ نانومولار siRNA (شکل ۷-ب)، در مقایسه با گروه کنترل پس از گذشت

خودنوزایی و تکثیر این سلول‌ها در نظر گرفته شود. مطالعه حاضر، بیان نوکلئوستمین در رده سلولی K562 و اثرات ناشی از مهار این ژن به واسطه استراتژی RNAi را برای اولین بار گزارش می‌نماید.

نتایج حاصل از RT-PCR نیمه کمی نشان داد که ژن نوکلئوستمین در سلول‌های K562 بیان بالایی دارد. این یافته مطابق با مطالعات قبلی مبنی بر بیش بیان نوکلئوستمین در رده‌های مختلف سرطانی از قبیل رده سلولی هپاتوکارسینوما (Hep G2)، دهانه رحم (Hela)، استئوسارکوما (OS-732)، سرطان مثانه (5637)، سرطان معده (SGC-7901)، سینه (MMK-7)، پروستات (PC-3) و برخی از انواع بافت‌های سرطانی می‌باشد (۱۱-۹، ۱۶-۱۴). هم‌چنین بررسی‌ها در این زمینه بیان بیش از حد این ژن را در دیگر سلول‌های لوسمی از قبیل HL-60 و NB4 که رده سلولی لوسمی حاد پرومیلوسیتیک است را نیز گزارش کرده‌اند (۱۰، ۲۷). این یافته از آن لحاظ حائز اهمیت است که مطالعات اخیر با استفاده از تکنیک RT-PCR در نمونه‌های سالم خونی به عنوان گروه کنترل نشان داده است که نوکلئوستمین در نمونه‌های خونی سالم بیان نمی‌شود و فقط در چند مورد نادر به میزان کم بیان می‌شود (۱۶).

در مطالعه حاضر، مهار بیان ژن نوکلئوستمین باعث مهار رشد سلول‌های K562، توقف چرخه سلولی در فاز G₁ و القای آپوپتوز شد. این گونه مکانیسم تأثیر مهار نوکلئوستمین در برخی رده‌های سلولی سرطانی دیگر نیز به اثبات رسیده است. به عنوان مثال سرکوب بیان نوکلئوستمین در رده سلولی سرطانی پروستات (PC-3) و دو رده سلولی سرطان مثانه (SW1710 و 5637)، منجر به افزایش تعداد سلول‌ها در فاز G₁ چرخه سلولی همراه با کاهش در سرعت تکثیر سلول‌های PC-3 و وقوع آپوپتوز شده است (۱۴، ۱۵). به علاوه در مطالعه‌ای که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی و نیز در رده سلولی دهانه رحم (Hela) انجام گرفته است، نتایج مشابهی مبنی بر کاهش نرخ تکثیر سلولی و مهار چرخه سلولی در مرحله G₁ به دست آمده است. با این حال وقوع آپوپتوز در این

(الف)



(ب)



شکل ۷. تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562. چهار و هشت ساعت پس از انجام ترانسفکشن سلول‌ها با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین خصوصیات ظاهری آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید و میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفته است. (الف) تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های کنترل (ب) تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562 ترانسفکت شده با siRNA. وجود سلول‌های سبز و یا نارنجی با هسته متراکم حاکی از وقوع آپوپتوز می‌باشد.

بحث

یکی از مشکلات عمده در درمان اغلب سرطان‌ها از جمله لوسمی میلوئیدی مزمن، حذف سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشد (۳). لذا در سال‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای در زمینه شناخت ژن‌های درگیر در رشد و خودنوزایی سلول‌های لوسمیک در حال انجام است. از آنجایی که رده سلولی K562 دارای خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی (CD₃₄⁺CD₃₈⁻) می‌باشد (۲۶)، لذا می‌تواند مدل مناسبی برای بررسی نقش نوکلئوستمین در تنظیم

سلول‌ها گزارش نشده است (۱۷، ۲۸). اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی مهار بیان ژن نوکلئوستمین در رده سلولی HL-60 که مدلی برای لوسمی حاد می‌باشد مشاهده شده است. نکته جالب توجه در این مطالعه آن است که برخلاف نتایج مطالعات ما، مهار بیان ژن نوکلئوستمین با تمایز سلول‌های HL-60 به سمت رده مونوسیتی-گرانولوسیتی همراه بوده است (۱۰). این تفاوت‌ها تا حدی می‌تواند مربوط به اختلاف بین رده‌های سلولی باشد. با این حال مهار رشد و القای مرگ سلولی نقاط مشترک این مطالعات با نتایج ارائه شده در مطالعه ما می‌باشد.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که مهار بیان ژن نوکلئوستمین، ۲۴ ساعت پس از تیمار با siRNA باعث مهار رشد سلول‌های K562 به صورت وابسته به زمان شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، کم‌کم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی افزایش یافته و در ۷۲ ساعت به بیشترین حد رسید. به نظر می‌رسد سلول‌های K562 در پاسخ به نبود نوکلئوستمین، ابتدا متحمل مهار رشد و سپس به مرحله آپوپتوز وارد می‌شوند. این داده‌ها توسط فلوسایتومتری نیز تأیید شد. به این ترتیب که تا زمان ۴۸ ساعت، چرخه سلولی در مرحله G₁ متوقف شد، اما پس از ۴۸ ساعت از تعداد سلول‌ها در مرحله G₁ کاسته شده و سلول‌ها وارد مرحله sub-G₁ شدند. به نظر می‌رسد وقوع آپوپتوز پس از مهار چرخه سلولی در مرحله G₁، مکانیسم اثر مهار نوکلئوستمین در سلول‌های K562 باشد.

در زمینه مکانیسم احتمالی اثر نوکلئوستمین در القای مهار چرخه سلولی و سپس آپوپتوز فرضیات متفاوتی مطرح است. مطالعات اولیه در زمینه نحوه عملکرد نوکلئوستمین بر پایه میان‌کنش نوکلئوستمین با پروتئین p53 بوده است (۲۹). نوکلئوستمین با اتصال به GTP و ورود به شیره هسته با پروتئین p53 میان‌کنش می‌دهد و به طور مستقیم یا غیرمستقیم از عملکرد مهار چرخه سلولی p53 جلوگیری می‌کند (۷). اما با در نظر گرفتن این مطلب که سلول‌های K562 مورد مطالعه در این آزمایش نیز همانند رده سلولی سرطانی HL-60، PC-3 و 5637 فاقد پروتئین

p53 عملکردی می‌باشند (۳۰)، ولی در همین حال القای آپوپتوز و مهار چرخه سلولی به دنبال مهار نوکلئوستمین در این سلول‌ها از طریق مکانیسم‌های مستقل از p53 متصور می‌شود (۱۹). در این راستا مشخص شده است که p53 تنها پروتئین پایین دستی در مسیر تنظیمی نوکلئوستمین نیست، بلکه ژن‌های دیگری نیز به طور مستقیم یا غیرمستقیم با نوکلئوستمین در کنترل تکثیر و تمایز در سلول‌های سرطانی نقش ایفا می‌کنند. به عنوان مثال p21 یک کانیدای می‌تواند باشد. اگرچه این فرضیه در مقاله جعفر نژاد و همکاران رد شد (۱۹).

در سال‌های اخیر مشخص شده که نوکلئوستمین به پروتئین سرین ترئونین فسفاتاز B56 (Regulatory subunit B human protein phosphates 2-PPP2R5A) متصل می‌شود و نقش مهمی در کنترل منفی رشد و تکثیر سلولی ایفا می‌کند. بنابراین احتمالاً نوکلئوستمین آپوپتوز را از طریق PPP2R5A کنترل می‌کند (۱۴، ۳۱). اما شناخت دقیق مکانیسم عمل آن نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه دارد. در مطالعه‌ای که در رده سلولی HeLa انجام شده است، پس از مهار بیان ژن نوکلئوستمین با siRNA، با استفاده از تکنیک Oligonucleotide DNA microarray نشان داده‌اند که برخی ژن‌های درگیر در چرخه سلولی، آپوپتوز و تمایز از قبیل Cyclin-dependent kinase (CDKN1A) و c-Myc، inhibitor 1A (CDC20) Cell division و cycle 20 homolog با عملکرد تنظیمی نوکلئوستمین در این رده سلولی مرتبط هستند (۱۱). با این حال شناسایی دقیق مکانیسم عملکرد نوکلئوستمین و شناسایی سایر پروتئین‌های مرتبط با آن، نیازمند تحقیقات گسترده‌ای می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مهار بیان نوکلئوستمین منجر به کاهش تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز در رده سلولی K562 می‌شود که مؤید نقش عمده این ژن در تنظیم رشد و تکثیر سلول‌ها و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد. خاموشی بیان این ژن

other malignancies. *World Journal of gastroenterology*. 2004;10(9):1246-9.

10. Yue B, Lu J, Wang Y, Yu L, Wang Q, Liu S, et al. Effects of Nucleostemin gene silencing on morphology and cytochemistry of HL-60 cells. *Life Science Journal*. 2008;5(2):9-14.

11. Liu S, Zhang Z, Zhang D, Sui X, Liu Y, Cai Z, et al. Gene profiling after knocking-down expression of nucleostemin in HeLa cells using oligonucleotide DNA microarray. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2006; 25(4):575-83.

12. Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem cells*. 2006; 24(4):1113-20.

13. Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neuroscience letters*. 2005; 390(2):81-6.

14. Liu R, Zhang Z, Zhao W, Wang M, Qi S, Li J, et al. Expression of nucleostemin in prostate cancer and its effect on the proliferation of PC-3 cells. *Chinese Medical Journal -beijing-english edition*. 2008; 121(4):299-304.

15. Nikpour P, Mowla S, Jafarnejad S, Fischer U, Schulz W. Differential effects of nucleostemin suppression on cell cycle arrest and apoptosis in the bladder cancer cell lines 5637 and SW1710. *Cell proliferation*. 2009; 42(6):1-8.

16. Yue B, Sun L, Zhao X, Chen Y, Wang Q, Liu S, et al. Expression of Nucleostemin Gene in Human Acute Leukemic Cells. *Baohong Yue, Ling Sun, Xiaoqiang Zhao, Yanli Chen*. 2006; 3(2):12-16.

17. Jafarnejad S, Mowla S, Matin M. [Functional Inhibition of nucleostemin gene-according of self-renewal ability- in bone marrow derived mesenchymal stem cells by RNAi strategy]. *Journal of Iranian anatomical Sciences*. 2006; 4(3):205-214.

18. Nikpour P, Jafarnejad SM, Forouzandeh M, Mowla SJ. [Knocking down of nucleostemin gene expression in human bladder cancer cell line by RNA interference strategy]. *Modarres journal of medical sciences*. 2007-8;10(3):85-93.

19. Jafarnejad S, Mowla S, Matin M. Knocking-down the expression of nucleostemin

می تواند به عنوان یک هدف بالقوه در ریشه کن کردن سلول های K562، به عنوان مدل سلول بنیادی لوسمی میلونیدی مزمن باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز که هزینه قسمتی از طرح را متقبل فرموده اند و مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ابراز می دارند.

منابع

- Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Szaśniadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *Journal of applied genetics*. 2008; 49(2):193-9.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. 2001; 414:105-111.
- Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004;51(1):1-28.
- Tsai RYL, McKay RDG. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes & development*. 2002;16(23):2991-3003.
- Tsai RYL, McKay RDG. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *The Journal of cell biology*. 2005;168(2):179-84.
- Meng L, Yasumoto H, Tsai RYL. Multiple controls regulate nucleostemin partitioning between nucleolus and nucleoplasm. *Journal of cell science*. 2006;119(24):5124-36.
- Ma H, Pederson T. Depletion of the nucleolar protein nucleostemin causes G1 cell cycle arrest via the p53 pathway. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(7):2630-5.
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current opinion in cell biology*. 2001;13(3):332-7.
- Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, et al. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and

- significantly decreases rate of proliferation of rat bone marrow stromal stem cells in an apparently p53-independent manner. Cell proliferation. 2008;41(1):28-35.
20. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek C, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*. 2003; 17(7):1211-62.
21. Epstein FH, Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(3):164-72.
22. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. *ASH Education Program Book*. 2009; 2009(1): 453-60.
23. Hirose M. Biology and modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *International journal of hematology*. 2002;76:206-11.
24. Feizi H. The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line. *Arak Medical University Journal*. 2010;13(3):1-11.
25. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2005; 38(4): 391-8.
26. Moore S, Haylock DN, Lévesque JP, McDiarmid LA, Samels LM, To LB, et al. Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34+ cells. *Blood*. 1998; 92(7):2461-70.
27. Huang M, Itahana K, Zhang Y, Mitchell BS. Depletion of guanine nucleotides leads to the Mdm2-dependent proteasomal degradation of nucleostemin. *Cancer research*. 2009; 69(7): 3004-12.
28. Sijin L, Ziwei C, Yajun L, Meiyu D, Hongwei Z, Guofa H, et al. The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the in vitro proliferation and in vivo tumorigenesis of HeLa cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2004;23:529-38.
29. Dai MS, Sun XX, Lu H. Aberrant expression of nucleostemin activates p53 and induces cell cycle arrest via inhibition of MDM2. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(13):4365-76.
30. Lübbert M, Miller C, Crawford L, Koeffler H. p53 in chronic myelogenous leukemia. Study of mechanisms of differential expression. *The Journal of experimental medicine*. 1988; 167(3): 873-86.
31. Yang HX, Jin GL, Meng L, Zhang JZ, Liu WB, Shou CC. Screening and identification of proteins interacting with nucleostemin. *World Journal of gastroenterology*. 2005;11(31):4812-14.