خون
دوره ۶ شماره ۱ بهار ۸۸ (۲۹-۲۱)

بیان ژن نوکلئوستمین در لوسمی حاد پرومیلوسیتیک در ارتباط با داروی ارسنیک تری اکسید و تمایز سلولی

دکتر فاطمه نادعلی[۱]، دکتر کامران علی مقدم[۲]، شهربانو رستمی[۳]، دکتر اردشیر قوام‌زاده[۴]

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی حاد پرومیلوسیتیک(APL)، یک لوسمی حاد میلوئیدی تمایزپذیر است. سابقاً این تمایز توسط داروی ATRA امکان‌پذیر بوده، اما اخیراً داروی ارسنیک تری‌اکسید به این روش درمانی اضافه شده است. مکانیسم‌های سلولی تمایز در اثر این دارو هنوز به خوبی مشخص نگردیده است. در این مطالعه رابطه تمایز سلولی داروی ارسنیک با میزان بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان یک عامل تکثیر سلولی، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود. در این مطالعه از سلول NB4 که یک رده لوسمی حاد پرومیلوسیتیک است استفاده شد و داروی ارسنیک با غلظت ۰/۵ ، ۱ و ۲ میکرومول بر روی آن اثر داده شد و پس از ۵ روز تاثیر دارو، از نقطه نظر تمایز سلولی با استفاده از مارکر تمایزی CD11b و از نقطه نظر مولکولی با استفاده از بررسی بیان ژن نوکلئوستمین با استفاده از Real Time – PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن با استفاده از آزمون من‌ویتنی بررسی و تحلیل شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت ۰/۵ میکرومول از داروی ارسنیک نه تنها باعث ایجاد تمایز سلولی نشده بلکه باعث افزایش تکثیر سلولی در ده روز اول کشت گردید ولی غلظت یک میکرومول دارو پس از ۵ روز باعث افزایش درصد مارکر تمایزی CD11b از ۵/۲ به ۱۳/۶ درصد شد که این تفاوت معنی‌دار می‌باشد. هم چنین غلظت یک میکرومول داروی ارسنیک باعث کاهش بیان ژن نوکلئوستمین به صورت قابل توجه گردید و تعداد کپی ژن از ۱۳۰ به ۷۰ رسید که اختلاف آن معنی‌دار می‌باشد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت یک میکرومول از داروی ارسنیک در مدت ۵ روز توانسته است افزایش جزئی در درصد CD11b ایجاد کند و در واقع باعث یک تمایز جزیی شده و در صورت افزایش مدت تماس دارو با سلول، ممکن است درصد بیان افزایش یابد. هم چنین افزایش درصد بیان CD11b و ایجاد تمایز سلولی همراه با کاهش بیان ژن نوکلئوستمین که یک عامل تکثیر سلولی می‌باشد همراه بوده است.

کلمات کلیدی: **لوسمی حاد پرومیلوسیتیک، ارسنیک تری اکسید، RT-PCR**

تاریخ دریافت : ۸۷/۵/۲۲
تاریخ پذیرش : ۸۸/۳/۴

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ـ خیابان هزار جریب ـ کدپستی ۱۷۶-۸۱۷۴۴
۲ـ فوق تخصص خون و انکولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی ـ دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لوسمی حاد پرومیلوسیتیک(APL)، یک زیر گروه لوسمی میلوبلاستیک است که با(۱۷ ؛ ۱۵)t مشخص می‌شود و به درمان‌های تمایز دهنده از جمله(ATRA) ALL Trans Retinoic Acid پاسخ می‌دهد. اخیراً از داروی ارسنیک تری اکسید که قبلاً به عنوان کارسینوژن شناخته شده بود در درمان آن استفاده می‌شود(۱). در مطالعه‌های مختلف دیده شده که ATRA باعث تمایز انتهایی و توقف رشد سلولی در رده‌های مختلف سلولی لوسمی حاد پرومیلوسیتیک از جمله HL60 ، NB4 با مکانیسم مشخص می‌شود و این در حالی است که مکانیسم پاسخ سلولی نسبت به ارسنیک کاملاً مشخص نیست(۴-۲). مطالعه‌ها بر روی رده سلولی NB4 نشان داده که در غلظت بالای ارسنیک(۵-۲ میکرومول)، آپوپتوز و در غلظت کم آن(۰/۵-۰/۱ میکرومول)، تمایز انتهایی ایجاد می‌شود(۵). این تمایز انتهایی در سلول HL60 به صورت جزیی بوده و به ژن C-MYC نسبت داده شده است. در سلول‌های گرانولوسیتی متمایز شده، بیان مارکر CD11b افزایش داشته و این افزایش کمتر از ده درصد بوده است(۶).

با گسترش دامنه تحقیقات، دانش پزشکی در مورد ژن‌های دخیل در تکثیر و تمایز سلول‌های سرطانی افزایش چشمگیری داشته است. اخیراً پروتئین‌های هسته‌ای را یک عامل کنترل کننده رشد و تکثیر سلولی می‌دانند و یکی از این پروتئین‌ها به نام نوکلئوستمین می‌باشد. پروتئین نوکلئوستمین در سلول‌های بنیادی جنینی، بالغین و چندین رده سلولی دیده شده است و در طی تمایز سلولی از میزان آن کاسته می‌شود(۷).

پروتئین نوکلئوستمین در هستک سلول متمرکز است و ژن آن بر روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد. از نوکلئوستمین به عنوان عامل تکثیر سلول‌های استرومایی مغز استخوان افراد بالغ و موش نام برده شده است(۹، ۸). بیان ژن نوکلئوستمین در بافت طبیعی و غیر بدخیم کلیه و هم چنین انواع سرطان‌های کلیه و لنفوسیت‌های T طبیعی و فیبروبلاست‌ها مشاهده شده است(۱۰). بیان ژن نوکلئوستمین در جفت به دلیل وجود سلول‌های بنیادی دیده شده و با استفاده از SiRNA بر علیه نوکلئوستمین توانسته‌اند قدرت تکثیر سلول Hela را کاهش دهند(۱۱). در بافت‌های سرطان معده و کبد و بافت‌های خوش خیم هیپرپلاستیک، بیان ژن نوکلئوستمین بالا بوده و در بافت‌های غددی پستانداران که در فاز نهایی تمایز بوده‌اند میزان آن کاهش داشته است(۱۲). از مطالعه‌هایی که تاکنون انجام شده مشخص می‌شود که نوکلئوستمین عامل دخیل در تکثیر سلولی اعم از تکثیر خوش خیم و بدخیم می‌باشد و با تمایز آن کاهش پیدا می‌کند. از آن جایی که در مورد نوکلئوستمین در سلول‌های هماتوپویتیک در منابع علمی گزارشی وجود نداشت، لذا بر آن شدیم که بیان آن را در لوسمی حاد پرومیلوسیتیک که یک لوسمی تمایز پذیر است، با استفاده از رده سلولی NB4 و داروی تمایز دهنده ارسنیک بررسی نماییم. بدین منظور داروی ارسنیک بر روی رده سلولی NB4 در محیط کشت اثر داده شد و اثر آن در سطح سلولی به وسیله فلوسیتومتری و در سطح مولکولی به وسیله Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود.

کشت سلول:

رده سلولی لوسمی حاد پرومیلوسیتیک به نام NB4 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت سلولی RPMI 1640 (جیبکو، انگلستان) با ۱۰٪ FBS کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت.

آماده‌سازی داروی ارسنیک تری اکسید و ATRA:

آمپول ۱۰ میلی‌گرمی ارسنیک تری اکسید(آلمان، مرک) تهیه شده و از آن رقت‌های مختلف در آب مقطر به دست آمد. هم چنین کپسول ۱۰ میلی‌گرم(آمریکا، رُوش) ATRA تهیه و به نسبت $\frac{۱}{۵}$ با اتانول و DMSO به صورت محلول در آمد و سپس فیلتر گردید.

ایجاد تمایز سلولی:

سلول NB4 در فاز لگاریتمی رشد سلولی، در پلیت‌های ۶ خانه در حجم ۳ میلی‌لیتر به تعداد ۵×۱۰^۵

Archive of SID
www.SID.ir

سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت، کشت داده شد. سپس غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومول از ارسنیک تری اکسید و غلظت یک میکرومول از ATRA بر روی سلول‌ها اثر داده شد. سلول‌ها به فاصله یک روز در میان پاساژ داده شد. تعویض محیط انجام شد و توسط لام هموسیتومترنئوبار، تعداد آن‌ها شمارش و توسط رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو درصد زنده بودن آن‌ها تعیین شد. جهت بررسی اثر داروها و ایجاد تمایز سلولی، بررسی CD11b توسط فلوسیتومتری انجام شد. هم چنین بیان ژن نوکلئوستمین قبل و بعد از درمان با دارو توسط Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای هر غلظت از دارو، آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد و میانگین اعداد به دست آمد.

فلوسیتومتری:

پس از ۱۵ روز تاثیر دادن سلول‌ها با داروی ارسنیک و ۵ روز داروی ATRA ، سلول‌ها به روش زیر مورد فلوسیتومتری قرار گرفتند. ابتدا ۲×۱۰^{۵} سلول در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از PBS (آمریکا، سیگما) با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی موشی ضد CD11b انسانی(دانمارک، داکو) که با رنگ قرمز RPE نشان داده شده بود، مجاور و مدت نیم ساعت در حرارت یخچال و تاریکی قرار داده شد. هم چنین در لوله ایزوتیپ کنترل(کنترل منفی) از آنتی‌بادی موشی(دانمارک، داکو)، IgG1 که با فلوروکروم RPE نشان داده شده بود استفاده شد و لوله‌ها در حرارت ۴°C و در تاریکی به مدت نیم ساعت قرار داده شدند. سپس سلول‌ها با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm دو بار شسته و سانتریفوژ شدند و نتایج با استفاده از کولتر کانتر مدل Epics ساخت آمریکا به دست آمد.

Real Time-PCR :

سلول‌های NB4 که تحت تاثیر داروهای ارسنیک تری اکسید و ATRA قرار گرفته بودند، از نظر تعداد کپی نوکلئوستمین مورد بررسی قرار گرفتند. برای نوکلئوستمین در منابع، سه واریانت از cDNA با شماره‌های شناسایی ۲۰۶۸۲۶ و ۲۰۶۸۲۵ و ۵۱۴۳۶۶ وجود داشت که ابتدا توسط نرم‌افزار Alignement ، مناطق مشترک بین این سه واریانت به دست آمد و سپس توسط شرکت فرآیند دانش(تهران ـ ایران) برای آن آغازگر طراحی شد و توسط کمپانی MWG آلمان سنتز شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

ابتدا با استفاده از محلول تریزول، از سلول‌ها RNA استخراج و از نظر کمی و کیفی بررسی شد و سپس با استفاده از آنزیم MMLV و راندوم هگزامر از روی RNA ، سنتز cDNA صورت گرفت. سپس بخشی از ژن نوکلئوستمین به طول ۲۹۸ bp و بخش از ژن GAPDH به طول ۲۲۶ bp توسط PCR تکثیر شد و با استفاده از روش کلونینگ T/A ، ژن‌های مورد نظر کلون شدند. سپس با رسم منحنی استاندارد برای این دو ژن، Real Time-PCR در مورد سلول‌های درمان شده با داروی ارسنیک و ATRA انجام شد، تعداد کپی ژن نوکلئوستمین قبل و بعد از درمان به دست آمد و در ارتباط با تمایز سلولی مورد بررسی قرار گرفت(نمودارهای ۲ و ۳). توالی آغازگرها و پروب‌های مورد استفاده عبارتند از:

GAPDH Forward 5-AAGGTGAAGGTCGGATCAA-3
GAPDH Reverse5-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3
GAPDH Probe 5-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3
NS Forward 5-AGTTCCAAAcaGTGCTCCC-3
Ns Reverse 5-AAAGCCCAAACTCCTTTCC-3
NS Probe 5-CTA AAA CAG CAG CAG AAA CTT GAC AGG C-3'

پروب‌ها در انتهای '۵ به وسیله(FAM) -6-carboxy- fluorescein phosphoramidite و در انتهای '۳ به وسیله 5-carboxytetramethyl- rhodamine (TAMRA) نشاندار شدند. واکنش Real Time-PCR با استفاده از دستگاه Lightcycler در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دمای آنیلینگ برابر با ۵۸°C و ۳۵ سیکل انجام شد. واکنش‌ها به صورت دوتایی انجام شد و اگر میزان NS/GAPDH در دو واکنش بیش از ۲ برابر اختلاف داشت، آزمایش تکرار می‌شد. برای اندازه‌گیری حساسیت، سریال رقتی از رده سلولی NB4 تهیه شد و زمانی که cDNA از ۱ میکروگرم RNA تهیه شد تا رقت $۱۰^{-۵}$ قابل شناسایی بود.

نتیجه نهایی در این روش به صورت اندازه‌گیری کمی مطلق (Absolute Quantitative) ، از طریق محاسبه تعداد کپی در نمونه به دست آمد.

Archive of SID
www.SID.ir

به منظور کمی‌سازی، نوکلئوستمین در مقابل GAPDH نرمالیزه شد. برای آنالیز اطلاعات در دستگاه Light Cycler، از برنامه نرم‌افزاری دستگاه به نام Second Derivative Maximum Method استفاده شد. در این روش به طور خودکار تعداد سیکل Cross Point هر نمونه مشخص گردید.(Cross point هر نمونه نقطه‌ای است که در آن سیکل وارد فاز لگاریتمی شده و اندازه‌گیری کمی نهایی در این نقطه با مقایسه با Cross point های نمونه‌ها نسبت به منحنی استاندارد به دست می‌آید). نتایج به صورت تعداد کپی گزارش شد. تحلیل یافته‌ها توسط آزمون من‌ویتنی انجام شد.

یافته ها

سلول NB4 به مدت ۱۵ روز تحت تاثیر ۰/۵ میکرومول داروی ارسنیک قرار گرفت که در طول ۱۰ روز اول تعداد سلول‌ها افزایش داشته و ارسنیک باعث تکثیر سلولی گردید(جدول ۱). ولی از روز دهم تکثیر سلولی متوقف شد و آثار تمایز از جمله افزایش بسیار جزیی CD11b دیده شد و از طرف دیگر غلظت یک میکرومول ارسنیک توانست به مدت ۵ روز تمایز معنی‌داری را ایجاد کند و بیان ژن نوکلئوستمین نیز کاهش داشت. هم چنین سلول NB4 به مدت ۵ روز تحت تاثیر داروی ATRA قرار گرفت و آثاری از تکثیر سلولی مشاهده نشد در عوض افزایش قابل توجه مارکر CD11b و کاهش بیان ژن نوکلئوستمین مشاهده شد(جدول ۲).

لازم به توضیح است که در غلظت ۲ میکرومول ارسنیک در روز چهارم، فقط ۱۰٪ سلول‌ها زنده و بقیه

جدول ۱: افزایش تعداد سلول NB4 در غلظت ۰/۵ میکرومول ارسنیک تری اکسید

روز کشت	تعداد سلول در ۳ میلی‌لیتر	درصد زنده بودن سلول‌ها
روز اول	۱۵×۱۰^۵	٪۹۹
روز سوم	۸۴×۱۰^۵	٪۹۸
روز پنجم	۱۶۴×۱۰^۵	٪۹۵
روز هفتم	۱۸۰×۱۰^۵	٪۹۷
روز نهم	۱۵۴×۱۰^۵	٪۹۹
روز یازدهم	۷۲×۱۰^۵	٪۹۴

مرده بودند و باعث مرگ سلولی شده بود. هم چنین یک میکرومول از داروی ATRA باعث تکثیر سلولی و یا مرگ سلولی نگردید بلکه باعث تمایز سلولی شد.

جدول ۲: نتایج فلوسیتومتری CD11b ناشی از اثر ارسنیک تری اکسید و ATRA بر روی سلول NB4

نوع دارو	ایزوتیپ کنترل(٪)	آزمایش (٪)
NB4 بدون دارو	۲/۴	۵/۲
NB4 همراه با ۰/۵ میکرومول ارسنیک	۲/۵	۸/۴
NB4 همراه با یک میکرومول ارسنیک	۲	۱۳/۶
NB4 همراه با یک میکرومول ATRA	۲	۵۰/۹

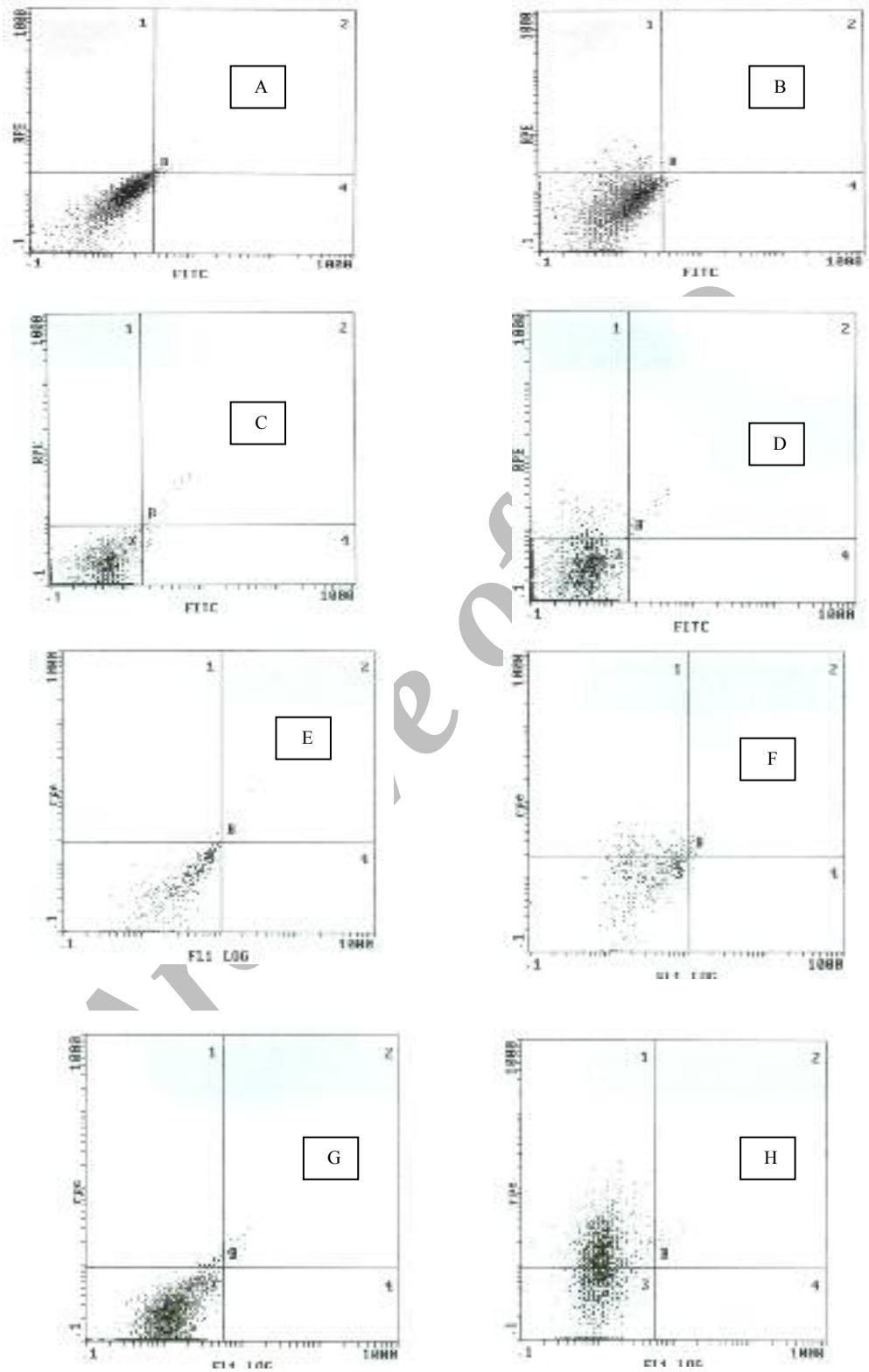
غلظت ۰/۵ میکرومول داروی ارسنیک اختلاف معنی‌داری در درصد CD11b ایجاد نکرده ولی این اختلاف در غلظت یک میکرومول با $p< ۰/۰۰۱$ معنی‌دار بوده است و در غلظت یک میکرومول داروی ATRA ، مارکر CD11b بر روی ۵۰/۹ درصد سلول‌ها بیان شده و اختلاف آن با $p< ۰/۰۰۱$ معنی‌دار می‌باشد(جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۳: نتایج اثر داروی ارسنیک و ATRA بر روی سلول NB4 به روش Real Time-PCR

نوع سلول وداروی مورد استفاده	تعداد کپی نوکلئوستمین
سلول NB4 بدون اثر دارو	۱۳۰
سلول NB4+ ۰/۵ میکرومول ارسنیک	۱۹۰
سلول NB4+ ۱ میکرومول ارسنیک	۷۰
سلول NB4+ ۱ میکرومول ATRA	۱۰
سلول NB4+ ۰/۵ میکرومول ارسنیک + یک میکرومول ATRA	۲۰

غلظت ۰/۵ میکرومول داروی ارسنیک باعث تمایز نشده ولی در غلظت یک میکرومول، یک تمایز جزیی با افزایش CD11b دیده می‌شود در حالی که در دوز یک میکرومول داروی ATRA به مدت ۵ روز ، تمایز قابل

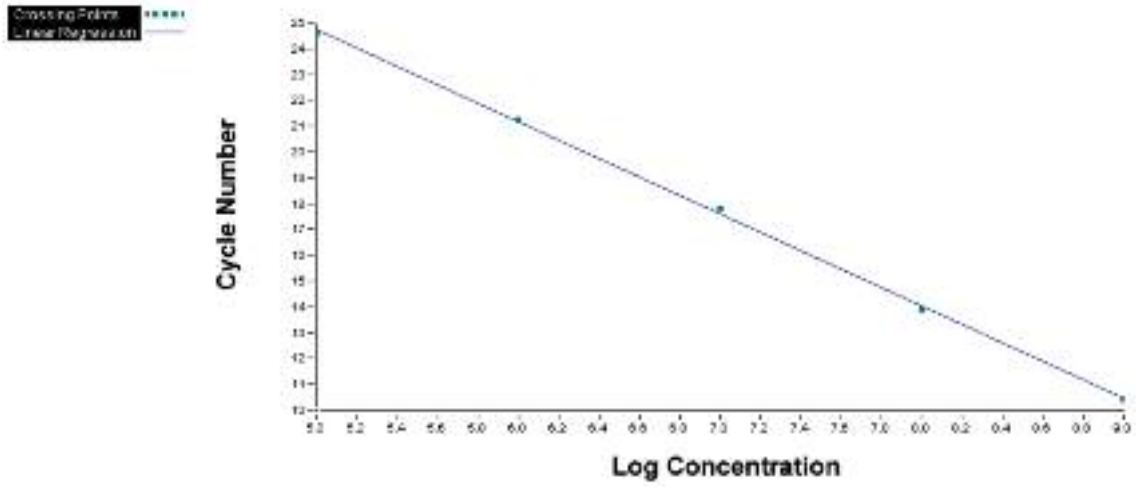
Archive of SID
www.SID.ir



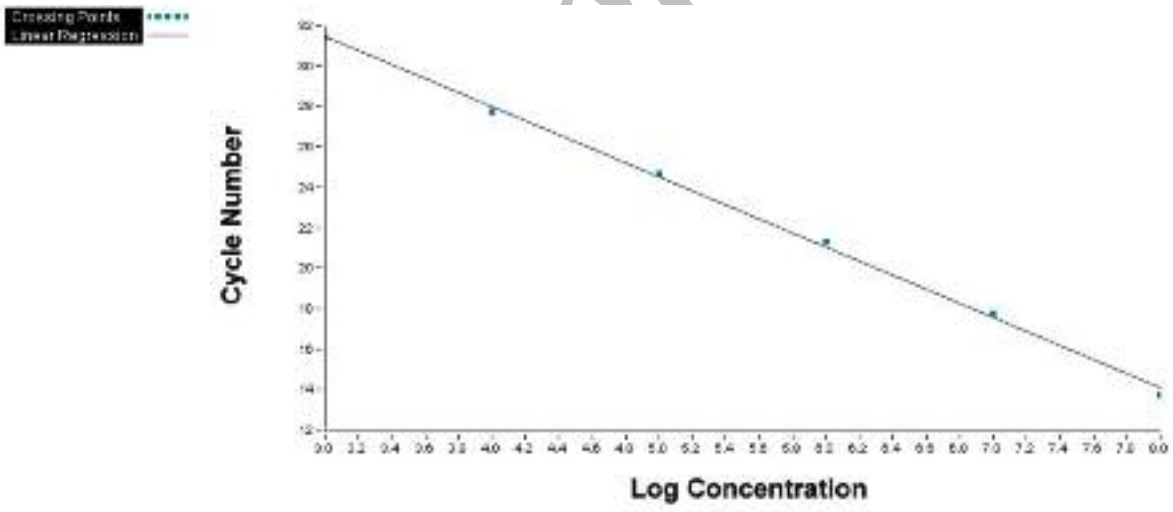
شکل ۱: درصد بیان CD11b در دوزهای مختلف داروها

A: ایزوتیپ کنترل B NB4 : تست C NB4 : ایزوتیپ کنترل غلظت ۰/۵ میکرومول ارسنیک D : آزمایش ۰/۵ میکرومول ارسنیک E : ایزوتیپ کنترل یک میکرومول ارسنیک F : آزمایش یک میکرومول ارسنیک G : ایزوتیپ کنترل یک میکرومول H ATRA : آزمایش یک میکرومول ATRA

www.SID.ir



نمودار ۲: منحنی استاندارد ژن GAPDH



نمودار ۳: منحنی استاندارد ژن نوکلئوستمین

توجهی با افزایش بیان CD11b دیده می‌شود(جدول ۲ و شکل ۱).

تعداد کپی نوکلئوستمین پس از ۵ روز درمان با غلظت ۰/۵ میکرومول از داروی ارسنیک تری‌اکسید نه تنها کم نشده بلکه مقداری نیز افزایش داشته و این در شرایطی است که تکثیر سلولی نیز افزایش داشته است(جدول ۳). در غلظت یک میکرومول ارسنیک، تعداد کپی ژن نوکلئوستمین کاهش واضح را نشان داده و بیشترین کاهش در استفاده از یک میکرومول داروی ATRA دیده می‌شود و این در حالی است که بیان مارکر CD11b در این دوز داروی ATRA بیش از مصرف داروی ارسنیک بوده است(جداول ۲ و ۳).

بحث

لوسمی حاد پرومیلوسیتیک(APL)، یک زیر گروه از لوسمی‌هاست که به درمان‌های تمایز دهنده از جمله ATRA پاسخ می‌دهد و اخیراً از داروی ارسنیک تری اکسید که قبلاً به عنوان کارسینوژن شناخته شده بود در

www.SID.ir

درمان آن استفاده شده است(۱). بر اساس مطالعه‌های مختلف، مشخص شده که ATRA باعث تمایز انتهایی و توقف رشد سلولی در رده‌های مختلف سلولی لوسمی حاد پرومیلوسیتیک از جمله HL60 و NB4 با مکانیسم مشخص می‌شود، در حالی که مکانیسم پاسخ سلولی نسبت به ارسنیک کاملاً مشخص نیست(۴-۲). مطالعه‌ها بر روی سلول NB4 نشان داده که در غلظت بالای ارسنیک(۲-۰/۵ میکرومول)، آپوپتوز و در غلظت کم آن(۰/۵- ۰/۱ میکرومول) تمایز انتهایی ایجاد می‌شود(۵). هم چنین ژانگ نشان داده که غلظت ۲-۰/۵ میکرومول ارسنیک ایجاد آپوپتوز و غلظت ۰/۵-۰/۱ میکرومول آن تمایز جزئی ایجاد می‌کند(۱). در مطالعه حاضر، غلظت ۰/۵ میکرومول ارسنیک بر ایجاد تمایز سلولی بدون تاثیر بوده و باعث افزایش معنی‌دار مارکر CD11b که یک مارکر تمایز سلولی گرانولوسیتی و منوسیتی است نگردیده در حالی که غلظت یک میکرومول ارسنیک باعث افزایش جزئی و یک تمایز جزئی سلول NB4 به رده گرانولوسیتی شده و درصد CD11b از ۵/۲ درصد به ۱۳/۶ درصد افزایش پیدا کرده که اختلاف آن با ۰/۰۰۱ >p معنی‌دار می‌باشد(جدول ۱ و شکل ۱). این در حالی است که یک میکرومول داروی ATRA باعث افزایش ۱۰ برابری مارکر CD11b بر روی سلول NB4 گردیده است. هم چنین در مطالعه حاضر سلول NB4 در غلظت دو میکرومول دچار مرگ سلولی شده و فقط ۱۰٪ سلول‌ها در روز چهارم کشت زنده بودند و این همانند نتایج دیگران است که در غلظت دو میکرومول سلول‌ها دچار مرگ سلولی شده‌اند(۵).

گوشنگ یانگ در تاثیر ۵ روزه داروی ارسنیک بر روی سلول HL60 نشان داد که در غلظت ۰/۵ میکرومول دارو، افزایش CD11b به میزان کمتر از ۱۰٪ دیده می‌شود(۶). در مطالعه حاضر نیز همان‌گونه که در جدول ۲ دیده می‌شود، درصد CD11b از ۵/۲ درصد به ۱۳/۶ درصد رسیده و کمتر از ۱۰ درصد افزایش داشته است. در مطالعه حاضر همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شد، سلول NB4 در طی ۱۰ روز اول افزایش پرولیفراسیون داشته و تمایز جزئی در غلظت نیم میکرومول از روز دهم به بعد که کاهش پرولیفراسیون اتفاق افتاده ایجاد شده است. در یک مطالعه که توسط گویانگ چن انجام شده، در یک سوم بیماران در هفته دوم تا سوم از شروع درمان، هیپرلکوسیتوز مشاهده شده است(۱۳).

این یافته همانند مطالعه حاضر بر روی رده سلولی NB4 می‌باشد که در دوز نیم میکرومول، در ۱۰ روز اول افزایش تکثیر دیده شد. در این مطالعه رابطه بین تمایز سلولی و بیان ژن نوکلئوستمین در سلول NB4 مورد بررسی قرار گرفته است و همان گونه که در جدول ۳ نشان داده شده غلظت ۰/۵ میکرومول داروی ارسنیک نه تنها باعث کاهش بیان این ژن نشده بلکه افزایش نیز داشته است. شاید علت آن تکثیر سلولی در ده روز اول بوده و بیشترین میزان کاهش در بیان ژن نوکلئوستمین در غلظت یک میکرومول ارسنیک، ایجاد شده که این کاهش بیان، همراه با افزایش مارکر تمایزی CD11b بوده است. هم چنین در مقایسه با ارسنیک، داروی ATRA باعث بیان کاهش یافته ژن نوکلئوستمین به طور قابل توجهی شده که این مساله هم زمان با افزایش قابل توجه CD11b بر روی سلول‌ها بوده است. همان گونه که از نتایج بر می‌آید، قدرت تمایز دهندگی ATRA بیش از ارسنیک می‌باشد، ولی به علت مقاومت دارویی نسبت به ATRA، بیمار باید از داروهای دیگر استفاده کند که ارسنیک در زمره این داروهاست. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌های دیگران از جمله لیوسی مبنی بر این که بیان ژن نوکلئوستمین در بافت‌های دارای هیپرپلازی خوش خیم و هم چنین سرطان معده و کبد بالاست و با تمایز سلولی کاهش پیدا می‌کند مطابقت دارد(۱۲). هم چنین با نتایج حاصل از مطالعه سی‌جین که توسط SiRNA توانسته خاصیت تکثیر سلولی Hela را مهار کند و بیان ژن کاهش پیدا کند مطابقت دارد و در کاهش تکثیر سلول بیان ژن تاثیر داشته است(۱۱).

در مطالعه حاضر ارسنیک توانسته است سلول‌ها را به سمت تمایز سلولی هدایت کند و از میزان بیان ژن نوکلئوستمین که یک عامل تکثیر سلولی است بکاهد.

نتیجه‌گیری

داروی ارسنیک توانسته است در غلظت یک میکرومول، باعث کاهش تکثیر سلولی و ایجاد تمایز جزئی پس از ۵ روز درمان با این دارو در سلول NB4 شود و این تمایز

Archive of SID
www.SID.ir

جزئی با کاهش بیان ژن نوکلئوستمین که یک عامل تکثیر سلولی می‌باشد همراه بوده است. در ضمن مشخص نیست که آیا تکثیر سلولی متوقف می‌شود و سپس تمایز اتفاق می‌افتد و یا این که پس از ایجاد تمایز، دیگر سلول قادر به تکثیر نیست که جا دارد از نظر سلولی و مولکولی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

در صورتی که بتوان توسط روش‌های مهار ژن نوکلئوستمین خاصیت تکثیر سلول‌های لوسمیک را کاهش داد، گام مهمی در جهت درمان این بیماران صورت گرفته است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران به تصویب رسیده و با حمایت‌های مالی و تجهیزاتی آن مرکز انجام و به پایان رسیده است که بدین وسیله از کلیه مسؤولین و پرسنل صمیمی آن مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

References :

1- Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. Oncogene 2001; 20(49): 7146-53.

2- Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77(5): 2936-40.

3- Taimi M, Breitman TR. Growth, differentiation, and death of retinoic acid-treated human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. Exp Cell Res 1997; 230(1): 69-75.

4- Kwong YL, Todd D. Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia. Blood 1997; 89(9): 3487-8.

5- Cai X, Yu Y, Huang Y, Zhang L, Jia PM, Zhao Q, *et al*.Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Leukemia 2003; 17(7): 1333-7.

6- Jiang G, Albihn A, Tang T, Tian Z, Henriksson M. Role of Myc in differentiation and apoptosis in HL60 cells after exposure to arsenic trioxide or all-trans retinoic acid. Leuk Res 2008; 32(2): 297-307.

7- Tsai RY, McKay RD.A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes Dev 2002; 16 (23): 2991-3003.

8- 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.

9- 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. Neurosci Lett 2005; 390(2): 81-6.

10- Fan Y, Liu Z, Zhao S, Lou F, Nilsson S, Ekman P, *et al*. Nucleostemin mRNA is expressed in both normal and malignant renal tissues. Br J Cancer 2006; 94(11): 1658-62.

11- 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. J Exp Clin Cancer Res 2004; 23(3): 529-38.

12- 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 other malignancies. World J Gastroenterol 2004; 10(9): 1246-9.

13- Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, *et al*. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As2O3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. Blood 1997; 89(9): 3345-53.

Archive of SID

www.SID.ir

Nucleostemin gene expression in acute promyelocytic leukemia in relation to arsenic trioxide and cell differentiation

Nadali F.[1](PhD), Alimoghaddam K.[2](MD), Rostami Sh.[2](MS), Ghavamzadeh A.[2](MD)

[1]*Pathology Department, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran*
[2]*Hematology ,Oncology and BMT Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Acute Promyelocytic Leukemia (APL) is one subtype of acute myeloblastic leukemia; it responds to differentiation using All-Trans Retinoic Acid (ATRA). Recently, arsenic trioxide (As_2O_3) has been added to this method. The cellular mechanism of differentiation therapy by arsenic is not yet clear. We decided to study the relationship between cell differentiation using arsenic trioxide and nucleostemin gene as a proliferation marker.

Materials and Methods

In this descriptive study, we treated NB4 cell (a cell line in APL) with 0.5, 1, and 2 µM of arsenic trioxide in 6 well plates for five days. Then, cellular differentiation was assessed by flowcytometry for CD11b. Nucleostemin gene expression was also assessed by Real Time PCR.

Results

According to the results, cell proliferation has occurred by 0.5 µM arsenic trioxide and no differentiation was observed during 10 days of culture. With 1 µM concentration of arsenic, CD11b has raised from 5.2% to 13.6% during five days of culture ($p < 0.001$). Morever, 1 µM of arsenic caused decrease in nucleostemin gene copy number from 130 to 70.

Conclusions

According to the results, 1 µM of arsenic has increased CD11b in the cells and caused a partial differentiation during five days of culture. Increase in CD11b marker has also been associated with decrease in nucleostemin gene expression as a proliferation marker.

Key words: Leukemia, Promyelocytic, Acute, arsenic trioxide, RT- PCR
SJIBTO 2009; 6(1): 21-29

Received: 12 Aug 2008
Accepted:25 May 2009

Correspondence: Nadali F., PhD of Hematology. Assistant professor of Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences. Hezar Jerib St. P.O.Box: 81744-176, Isfahan, Iran. Tel: (+98311) 7922475; Fax: (+98311) 6688597
E-mail: *Nadalifa@yahoo.com*

Archive of SID
www.SID.ir