خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۰ شماره ۲ تابستان ۹۲ (۱۳۹-۱۲۹)

مقاله پژوهشی

اثر آپوپتوزی ترکیب آرسنیک تری اکسید و آزیدوتیمیدین در سلول‌های رده لوسمی پرومیلوسیتی حاد(NB4) از طریق تغییرات بیان P21 و توزیع سیکل سلولی

سعید حسنی[۱]، فرهاد ذاکر[۲]، علی ذکری[۳]، اعظم زغل[۴]، کامران علی مقدم[۵]، اردشیر قوام‌زاده[۵]، سید حمیداله غفاری[۶]

چکیده

سابقه و هدف

داروی آرسنیک تری‌اکسید(ATO) که در درمان لوسمی پرومیلوسیتی حاد(APL) استفاده می‌شود، دارای عوارض جانبی شدیدی می‌باشد. به منظور افزایش اثرات ضد سرطانی و استفاده از دوزهای پایین‌تر ATO، اثر ترکیب آن با داروی آزیدوتیمیدین(AZT) در القای آپوپتوز روی سلول‌های NB4 (رده APL) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، بعد از کشت و تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های AZT ۵۰ µM، ATO ۱ µM و ترکیب آن‌ها، آپوپتوز و توزیع سیکل سلولی با فلوسیتومتری و میزان mRNA ژن P21 با Real Time PCR در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

ATO به همراه افزایش توقف در مرحله G2/M، منجر به افزایش آپوپتوز(۷/۱۲ ± ۵۰/۱۴٪) در مقایسه با کنترل(۲/۹۷ ± ۳/۹٪) شده است. میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با ترکیب AZT و ATO (۴/۶۵ ± ۲۴/۳۵٪) در مقایسه با ATO تنها، همراه با کاهش نسبی سلول‌های موجود در مرحله G2/M و افزایش نسبی سلول‌های موجود در مرحله G1 مهار گشته است. ATO (۰/۱۴ ± ۰/۲۷) نسبت به کنترل(۰/۱ ± ۱) بر روی بیان ژن P21 اثر مهاری داشته ولی AZT (۰/۲۱ ± ۱/۸۱) و ترکیب AZT/ATO (۰/۳۲ ± ۲/۰۶) موجب افزایش آن شده‌اند.

نتیجه گیری

AZT، اثر آپوپتوزی ATO را احتمالاً از طریق القای بیان P21، گریز سلول از توقف در مرحله G2/M و افزایش توقف در مرحله G1 مهار می‌کند.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتی حاد، آرسنیک تری اکسید، آزیدوتیمیدین، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۲- PhD هماتولوژی ـ دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۳- دانشجوی دکترای ژنتیک پزشکی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۵- فوق تخصص خون و انکولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۶- مؤلف مسؤول: PhD ژنتیک مولکولی ـ دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران ـ کارگر شمالی ـ کدپستی: ۱۴۱۱۱

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL) که بر اساس تقسیم‌بندی گروه FAB (French-American-British) به عنوان AML-M3 توصیف می‌شود، از لحاظ سیتوژنتیک دارای t (15;17) بوده که محصول آن فیوژن پروتئین PML/RARα می‌باشد. اگر چه درمان این بیماری با ATRA موفقیت‌آمیز می‌باشد اما در بعضی موارد عود مجدد و مقاومت مشاهده می‌شود که در این موارد از ATO استفاده می‌گردد، البته از ATO در درمان بیماران تازه تشخیص داده شده نیز استفاده می‌شود(۲، ۱).

ATO حداقل از طریق دو مکانیسم فعالیت ضد لوکمیک خود را انجام می‌دهد: اول، تخریب PML/RARα و در نتیجه القای تمایز نسبی در پرومیلوسیت‌های غیر طبیعی، که به نظر می‌رسد همین مکانیسم مسؤول اثرات درمانی اختصاصی ATO علیه APL نیز باشد(۳). دوم، القای آپوپتوز در سلول‌های APL از طریق مکانیسم‌هایی مثل؛ توقف چرخه سلولی در مرحله میتوز و آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی(MAAA)، از دست رفتن پتانسیل غشای میتوکندری و رهاسازی سیتوکروم C در سیتوزول، افزایش فسفواستیلاسیون هیستون H3 در کروماتین کاسپاز-۱۰، فعال‌سازی سیستم CD95/CD95L ، کاهش pH داخل سلولی از طریق تسهیل فعالیت تعویض‌کننده آنیون ۲، افزایش بیان گروهی از ژن‌های مسؤول القای گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، آسیب اکسیداتیو DNA سلولی، مهار ژن‌های hTERT ، c17 و c-MYC به وسیله اکسیداسیون Sp1 توسط ROS ، کاهش فعالیت NF-κB و تغییر بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوزی در راستای القای آپوپتوز(۱۰-۴، ۱).

ATO در دوزهای پایین به تنهایی نمی‌تواند موجب آپوپتوز شود و برای حذف سلول‌های توموری با آن دوزهای بالا مورد نیاز است، اما دوز بالا موجب عوارض جانبی بر روی بیماران APL از قبیل هیپرلوکوسیتوز، سندرم تمایز APL ، افزایش ترانس آمیناز کبد، مشکلات تنفسی، اختلالات سیستم عصبی، اختلالات پوستی و مشکلات معدی روده‌ای می‌شود(۱۱). به منظور کاهش دوز ATO و دسترسی به افزایش اثرات شیمی درمانی، روش‌های درمانی به صورت استفاده ترکیبی از داروهایی که مکانیسم مشابه‌ای را برای جلوگیری از تکثیر و یا از بین بردن سلول‌های سرطانی دارند باید طراحی شود که از یک طرف موجب افزایش تاثیر درمان و از طرف دیگر موجب کاهش اثرات ناخواسته گردند. اثر سینرژیک بین ویتامین C و ATO، افزایش حساسیت به ATO در اثر بوتیونین سولفوکسیمین(Buthionine sulfoximine) به خاطر تهی شدن سلول از گلوتاتیون، تشدید آپوپتوز ناشی از ATO از طریق تقویت استرس اکسیداتیو با استفاده از ترولوکس (Trolox) و ایجاد تغییر در تلومر با دی‌اتیل‌اکسادی کربوکسانین(Diethyloxadicarbocyanine) مثال‌هایی از تقویت اثرات ATO در ترکیب با دیگر عوامل در *in vitro* روی سلول‌های سرطانی مختلف می‌باشند(۱۵-۱۲).

AZT یک آنالوگ تیمیدین است که هم اکنون برای درمان HIV مورد استفاده قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که این دارو دارای خواص ضد سرطانی متعددی نیز می‌باشد. برای مثال، AZT با داخل شدن در DNA می‌تواند منجر به سمیت بیشتری در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی گردد. چرا که سلول‌های سرطانی دارای تکثیر بالاتر و در نتیجه باز گردش بیشتری در تیمیدین می‌باشند. AZT رشد چهار رده سلولی سرطان پستان و یک رده سلولی پستان طبیعی را در خارج از بدن مهار می‌کند، اما دسترسی به این اثر روی سلول‌های طبیعی نیاز به غلظت‌های بالاتری دارد(۱۶). هم‌چنین AZT در رده‌های سلولی ملانوما موجب مهار رشد سلول و القای آپوپتوز می‌شود، بدون این که اثری روی رشد سلول‌های غیر توموری بگذارد(۱۷). مهار تکثیر با واسطه AZT همراه با توقف مشهود سیکل سلولی، القای آپوپتوز و یا هردو است(۱۹، ۱۸). به علاوه، سلول‌های سوماتیک طبیعی دارای فعالیت تلومراز کمی بوده و یا این که این فعالیت در آن‌ها قابل شناسایی نیست. در حالی که اکثر سلول‌های سرطانی تلومراز را بیان می‌کنند. تلومراز، یک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس است که نقش مهمی در تکثیر نامحدود سلول‌های سرطانی بازی می‌کند. AZT دارای اثرات مهاری روی فعالیت این آنزیم می‌باشد(۱۸).

وقتی AZT با دیگر عوامل شیمی درمانی مثل ۵-

Archive of SID
www.SID.ir

فلوئورویوراسیل و سیس پلاتین ترکیب شد، فعالیت ضد توموری قوی روی سلول‌های سرطانی در محیط کشت داشته است. این نتایج منجر به استفاده از AZT در ترکیب با دیگر داروهای شیمی درمانی در فازهای I و II مطالعه‌های بالینی در بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک کولورکتال و دیگر بدخیمی‌های پیشرفته شده است(۲۱، ۲۰).

چندین مکانیسم ضد سرطانی مشترک بین ATO و AZT وجود دارد که می‌تواند اثر تقویتی درمانی احتمالی را در هنگام استفاده ترکیبی از آن‌ها پیشنهاد کند، این اثرات مشترک شامل؛ متوقف ساختن چرخه سلولی، مهار NF-κB، کاهش میزان پروتئین c-MYC ، مهار فعالیت تلومراز، کاهش میزان پروتئین آنتی‌آپوپتوزی BCL2 و افزایش پروتئین آپوپتوزی کاسپاز ۳ می‌باشند(۲۵-۲۲، ۱۸، ۱۰، ۹، ۴، ۱).

هدف از این مطالعه؛ ارزیابی اثرات ترکیب AZT/ATO در مقایسه با ATO، بر روی پیشروی چرخه سلولی و القای آپوپتوز سلول‌های رده پرومیلوسیتی حاد (NB4) بوده است تا در صورت دارا بودن اثر تقویتی معنادار روی القای آپوپتوز، بتوان در آینده از ترکیب این دو دارو در درمان APL بهره‌مند شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و تیمار با دارو:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. رده سلولی APL (NB4) با t (15; 17) از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سپس بیان PML/RARα در آن با RT-PCR تایید شد. سلول‌ها در ابتدا به تعداد ۵×۱۰^۵ در هر میلی‌لیتر محیط RPMI ۱۶۴۰ (جیبکو) دارای ۱۰٪ FBS (جیبکو)، ۱۰۰U/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ mg/mL استرپتومایسین (بایوسرا – انگلستان) در انکوباتور مرطوب دارای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند. برای حذف اثرات احتمالی افزایش تعداد سلول بر روی رشد و بقای سلول، سلول‌ها به تعداد کمتر از $۱/۵ \times ۱۰^۶$ حفظ می‌شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با ۵۰ ماکرومولار AZT (سیگما) و ۱ ماکرومولار ATO (سینا دارو) و ترکیب آن‌ها تیمار شدند، از سلول‌های تیمار نشده نیز به عنوان کنترل استفاده شد. در این مطالعه دوز هر دو دارو بر اساس غلظت‌های فارماکولوژیک آن‌ها در پلاسما انتخاب شدند(۲۷، ۲۶).

بررسی کمی آپوپتوز با استفاده از فلوسیتومتری:

آپوپتوز با استفاده از Hoechst 33342 و Propidium iodide (اینویتروژن) از طریق فلوسیتومتری، طی مراحل زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها با PBS سرد شسته شدند، سپس تعداد آن‌ها در حدود ۱×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. در مرحله بعد، ۱ ماکرولیتر از محلول Hoechst (دارای غلظت ۵ mg در هر میلی‌لیتر آب) و ۱ ماکرولیتر از محلول PI (دارای غلظت ۱ mg در هر میلی‌لیتر آب) به هر میلی‌لیتر از سلول‌ها اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ، سلول‌ها به سرعت با فلوسیتومتری(آلمان، Partec PasIII) به ترتیب با انگیزش/ تشعشع ~ ۳۵۰/۴۶۱ و ~ ۵۳۵/۶۱۷ نانومتر برای Hoechst و PI ، ارزیابی شدند. در نهایت داده‌ها با نرم‌افزار FlowMax تجزیه و تحلیل شدند.

ارزیابی چرخه سلولی:

برای بررسی توزیع چرخه سلولی، سلول‌ها بعد از شستشو با PBS با اتانول ۷۰٪ فیکس شدند. در مرحله بعد این سلول‌ها با PI (۲۰ µg/mL) و RNAase A رنگ‌آمیزی و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در نهایت با فلوسیتومتری توزیع چرخه سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی کمی بیان ژن P21 با RQ-PCR :

بعد از استخراج RNA سلول‌ها(رُوش ، High pure RNA isolation kit)، مقدار RNA نمونه‌ها از طریق اسپکتروفتومتری (آمریکا ، ۱۰۰۰ - Nanodrop ND) اندازه‌گیری شد. برای ساخت cDNA ، ۱ ماکروگرم از RNA به طور معکوس رونویسی گشت(تاکارابیو، Prime Script RT reagent kit). برای انجام RT-PCR از دستگاه light cycler (آلمان، رُوش) و تکنولوژی SYBR Premix Ex Taq (تاکارابیو) استفاده شد. ۱۰ ماکرولیتر سایبرگرین،

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: توالی آغازگرهای ژن مورد هدف(P21) و ژن مرجع(HPRT)

شاخص ژنی	آغازگر	سکانس(۳' تا ۵')
CCTGTCACTGTCTTGTACCCT	جلوبرنده	P21
GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	معکوس	P21
TGGACAGGACTGAACGTCTTG	جلوبرنده	HPRT
CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	معکوس	HPRT

۲ ماکرولیتر cDNA ، ۰/۵ ماکرولیتر از آغازگرهای جلوبرنده و معکوس (۱۰ pmol) و ۷ ماکرولیتر آب فاقد نوکلئاز(آلمان، کیاژن) با هم در یک لوله کاپیلاری (رُوش) برای اجرای PCR در واکنشی به حجم ۲۰ ماکرولیتر مخلوط شدند. سپس PCR در مراحل زیر انجام شد: ۳۰ ثانیه انکوباسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان فعال‌سازی اولیه و سپس ۴۰ سیکل که هر سیکل شامل یک مرحله واسرشت به مدت ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و یک مرحله ترکیب شده آنیلینگ/اکستنشن به مدت ۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. از هایپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز ۱ (HPRT1) به عنوان ژن مرجع استفاده شده است(جدول ۱).

آنالیز آماری:

به منظور نشان دادن معنادار بودن داده‌ها از لحاظ آماری، روش student's t test (Microsoft Excel) مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج بررسی آپوپتوز با فلوسیتومتری:

فلوسیتومتری با استفاده از دو رنگ Hoechst 33342 و PI ، آزمایشی آسان و سریع را برای ارزیابی آپوپتوز بر پایه میزان فلورسانس حالت جمع شده هسته سلول‌های آپوپتوزی فراهم می‌کند. این آزمایش نشان داد که ATO در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده(کنترل) موجب افزایش چشمگیر آپوپتوز می‌شود، اما در ترکیب با AZT میزان آپوپتوز به آن شدت نبوده و کمتر از آپوپتوز ناشی از ATO تنها می‌باشد(جدول ۲). به این صورت که سلول‌های تیمار شده با ATO در غلظت ۱ ماکرو مولار تا ۵۰/۱٪ آپوپتوز داشتند، اما میزان آپوپتوز ناشی از ۵۰ ماکرو مولار AZT به تنهایی و در ترکیب با ۱ ماکرو مولار ATO به ترتیب ۱۹/۹٪ و ۲۴/۴٪ بوده است. در سلول‌های تیمار نشده نیز ۳/۹٪ آپوپتوز مشاهده می‌شد(شکل ۱).

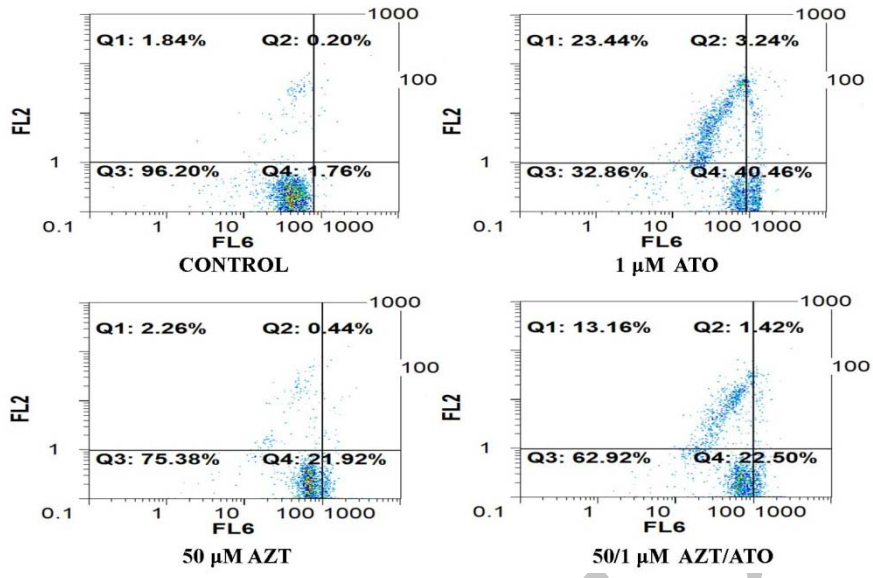
جدول ۲: میانگین و انحراف معیار میزان آپوپتوز حاصل از سه آزمایش جداگانه در سلول‌های NB4 تیمار نشده(کنترل) و تیمار شده با ATO و یا AZT

غلظت داروها	میانگین میزان آپوپتوز(٪) ± انحراف معیار	p value
سلول‌های تیمار نشده (کنترل)	۳/۹ ± ۲/۹۷	
۱ µM ATO	۵۰/۱۴ ± ۷/۱۲	۰/۰۱۴
۵۰ µM AZT	۱۹/۸۹ ± ۵/۱۱	۰/۰۶۲
۵۰ + ۱ µM AZT + ATO	۲۴/۳۵ ± ۴/۶۵	۰/۰۳۴

نتایج بررسی چرخه سلولی:

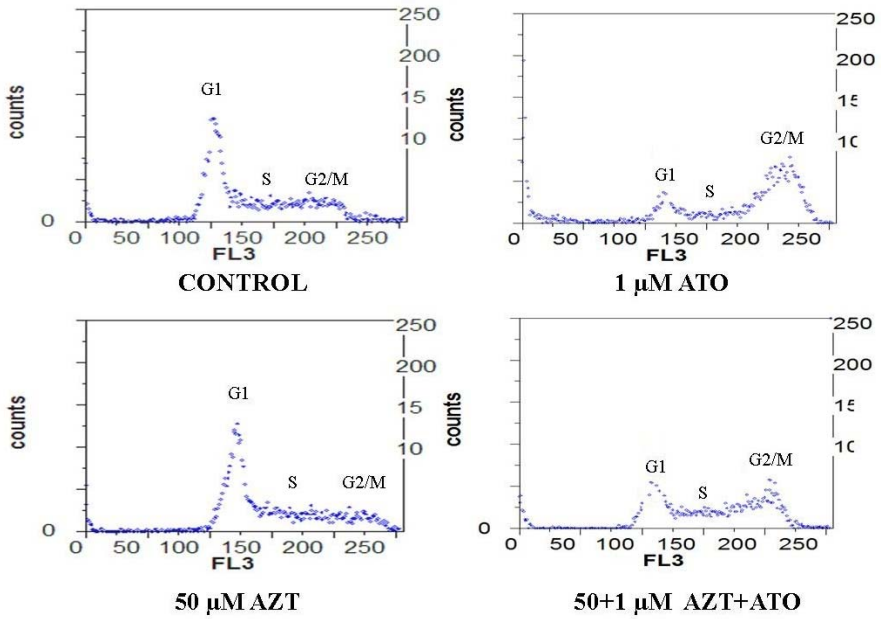
برای ارزیابی اثر AZT و ATO روی پیشروی چرخه سلولی از روش فلوسیتومتری با رنگ پروپیدیوم یداید استفاده شد. در سلول‌های تیمار شده با غلظت یک ماکرو مولار ATO (در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده)، کاهش چشمگیری در درصد سلول‌های موجود در فاز G1 مشاهده شد. اما AZT در غلظت ۵۰ ماکرومولار بر عکس ATO موجب افزایش درصد سلول‌های موجود در فاز G1 گشته و در ترکیب با ATO نیز موجب جلوگیری از القای کاهش شدید درصد سلول‌های موجود در فاز G1 ناشی از ATO شده است. به طور هم‌زمان، با کاهش درصد سلول‌های موجود در فاز G1 ، ATO به شدت موجب افزایش درصد

Archive of SID
www.SID.ir



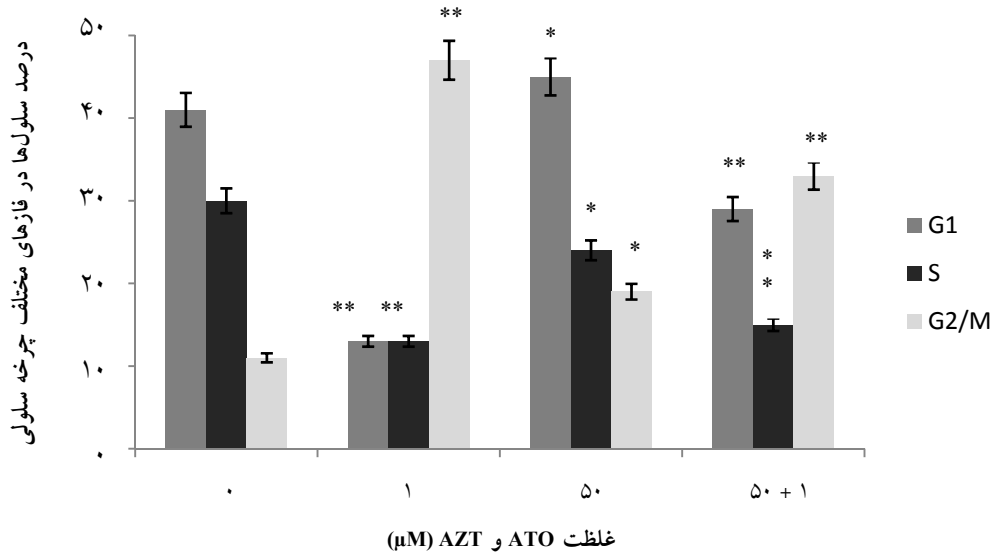
FL2: Propodium Iodide
FL6: Hoechest 33342

شکل ۱: AZT آپوپتوز القا شده توسط ATO در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتی حاد را مهار می‌کند. Q3 و Q4 به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های نرمال و پیش آپوپتوزی می‌باشند. رنگ Hoechst 33342 کروماتین متراکم شده سلول‌های آپوپتوزی را بیشتر از کروماتین سلول‌های نرمال رنگ می‌کند. Q1 و Q2 نشان‌دهنده سلول‌های مرده می‌باشند که به رنگ پروپیدیوم یداید اجازه ورود داده‌اند این رنگ تنها وارد سلول‌های مرده می‌شود و در آن جا می‌ماند.



شکل ۲: بررسی توزیع چرخه سلولی به وسیله فلوسیتومتری: منحنی‌ها نشان‌دهنده توزیع چرخه سلولی در سلول‌های NB4 می‌باشند که با دوز ۵۰ ماکرو مولار AZT و دوز ۱ ماکرومولار ATO به تنهایی و ترکیب این دو دارو با هم به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده‌اند. از سلول‌های تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شده است. محور افقی(FL3 ، رنگ PI) نشان‌دهنده محتوای نسبی DNA بوده و محور عمودی نشان‌دهنده تعداد سلول می‌باشد. همان طور که در شکل نشان داده شده نسبت‌های مشخصی از سلول‌ها در فازهای مجزایی از چرخه سلولی شامل G1 ، S و G2/M قرار دارند.

www.SID.ir



نمودار ۲: درصد سلول‌های موجود در فازهای مختلف سیکل سلولی(درصد سلول‌های مرده(Sub G1) نشان داده نشده است). مقادیر، حاصل از SD± میانگین دو آزمایش جداگانه می‌باشند. معنادار بودن داده‌ها از لحاظ آماری در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده(کنترل) به صورت ۰/۰۵ >p * و ۰/۰۱ >p ** نشان داده شده است.

سلول‌های موجود در فاز G2/M چرخه سلولی شده است. AZT نیز اگر چه در غلظت ۵۰ ماکرومولار موجب افزایش درصد سلول‌ها در فاز G2/M شده(در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده) ولی در ترکیب با ATO در مقایسه با ATO تنها، از شدت افزایش درصد سلول‌های موجود در فاز G2/M کاسته است. این دو دارو هم‌چنین موجب تغییر درصد سلول‌های موجود در فاز S نیز شده‌اند، ATO و AZT هر دو موجب کاهش سلول‌های موجود در فاز S چرخه سلولی می‌شوند. ولی در ترکیب ۵۰/۱ ماکرومولار AZT/ATO، این کاهش درصد در مقایسه با ATO تنها از میزانش کاسته شده است(شکل ۲ و نمودار ۱). این داده‌ها به وضوح نشان می‌دهد که AZT در القای کاهش درصد سلول‌های موجود در فاز G1 و S و برعکس القای افزایش درصد سلول‌های موجود در فاز G2/M توسط ATO مداخله کرده و از شدت اثراتش می‌کاهد.

نتایج بررسی میزان mRNA ژن P21 با qRT-PCR:

ژن p21 دارای نقش‌های شناخته شده‌ای در تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوز می‌باشد(۲۸). پس از تجزیه و تحلیل مقادیر ct های خوانده شده توسط دستگاه Light cycler ، مشخص شد که ATO در غلظت ۱ ماکرومولار موجب سرکوب رونویسی از ژن P21 نسبت به سلول‌های کنترل گشته است. این در حالی است که AZT در غلظت ۵۰ ماکرومولار به تنهایی و هم چنین در ترکیب با غلظت ۱ ماکرومولار ATO ، موجب افزایش رونویسی از ژن P21 شده است.

جدول ۲: میزان نسبی mRNA ژن p21 با استفاده از qRT-PCR در سلول‌های NB4 تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، بعد از نرمالایز کردن ctهای ژن هدف با ژن مرجع (hprt) اندازه‌گیری شد. مقادیر به صورت SD ± میانگین دو آزمایش جداگانه می‌باشند.

غلظت داروها	میانگین میزان آپوپتوز(٪) ± انحراف معیار	p value
سلول‌های تیمار نشده (کنترل)	۱ ± ۰/۱	
۱ µM ATO	۰/۲۷ ± ۰/۱۴	۰/۰۲۷
۵۰ µM AZT	۱/۸۱ ± ۰/۲۱	۰/۰۳۹
µM AZT + ATO ۵۰ + ۱	۲/۰۶ ± ۰/۳۲	۰/۰۴۶

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

با توجه به مکانیسم‌های مشابه‌ای که AZT و ATO روی سلول‌های سرطانی دارند مثل اثرات ضد تکثیری ناشی از متوقف کردن چرخه سلولی و القای آپوپتوز، این احتمال وجود داشت که استفاده از AZT به همراه ATO باعث تقویت اثر ATO در القای آپوپتوز سلول‌های APL شود، تا در مرحله بعد بتوان از آن به عنوان داروی کمکی به همراه ATO استفاده کرد(۱۸، ۱). ولی به طور شگفت‌آوری AZT نه تنها باعث افزایش اثر آپوپتوزی ATO روی سلول‌های NB4 نشده، بلکه حتی اثر آن را مهار کرده است.

به منظور یافتن دلیل این یافته، تاثیر AZT و ATO بر روی توزیع چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مکانیسم‌هایی که ATO به وسیله آن موجب مرگ سلول می‌شود، نوعی فاجعه میتوزی(mitotic catastrophe) است، یعنی ATO با ایجاد توقف چرخه سلولی در مرحله میتوز و آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی(MAAA ، mitotic arrest-associated apoptosis) موجب مرگ سلول می شود(۲۹، ۴). از آن جا که AZT یک آنالوگ نوکلئوتیدی است و می‌تواند با وارد شدن به داخل DNA موجب اختلال در روند طبیعی چرخه سلولی شود، انتظار می‌رفت که در ترکیب با ATO از طریق ایجاد تغییر در توزیع چرخه سلولی در مقایسه با ATO تنها، با کاهش تعداد سلول‌های موجود در فاز G2/M چرخه سلولی، از میزان آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی و فاجعه میتوزی ناشی از ATO بکاهد(۳۰، ۱۹، ۱۸). بررسی چرخه سلولی نیز نشان داد که اگر چه ATO تنها، از یک سو موجب افزایش تعداد سلول‌های موجود در فاز G2/M و از سویی دیگر موجب کاهش تعداد سلول‌های موجود در فاز G1 و S شده، ولی ترکیب AZT/ATO در مقایسه با آن به طور نسبی از تعداد سلول‌های متوقف شده در G2/M کاسته و بر عکس به تعداد سلول‌های موجود در G1 افزوده است. این مشاهده می‌تواند با کاهش نسبی آپوپتوز در سلول‌هایی که با AZT/ATO تیمار شده‌اند نسبت به سلول‌هایی که فقط با ATO تیمار شده‌اند قابل مقایسه باشد. بنابراین این احتمال وجود دارد که AZT وقتی با ATO ترکیب می‌شود، به علت ایجاد تغییر در توزیع چرخه سلولی در مقایسه با ATO تنها، به صورت کاهش تعداد سلول‌های موجود در مرحله G2/M چرخه سلولی و در نتیجه فرار سلول از آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی و فاجعه میتوزی که از مکانیسم‌های ATO برای القای آپوپتوز می‌باشد، موجب کاهش اثر آپوپتوزی ATO روی سلول‌های NB4 می‌شود.

برای یافتن دلیل مولکولی این مشاهده، به بررسی میزان سطح mRNA ،p21 پرداختیم. p21 پروتئینی است که دارای نقش شناخته شده‌ای در کنترل سیکل سلولی از طریق اتصال و تشکیل کمپلکس با G1/S-cdk (cyclin E/cdk2) و S-cdk (cyclin A/cdk2) و در نتیجه مهار فعالیت آن‌ها و توقف پیشرفت سیکل سلولی در مرحله G1 است(۲۸). هم‌چنین نشان داده شده که القای بیان این پروتئین موجب گریز از القای توقف در مرحله میتوز در اثر ATO ، آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی و فاجعه میتوزی می‌شود. p21 عمل فرار از توقف میتوزی و القای بقای سلول را به وسیله مهار cyclin B/CDC2 (cdk1) از طریق اتصال مستقیم و یا مهار فسفریلاسیون ترئونین 161 که برای فعالیت B/CDC2 لازم است، انجام می‌دهد(۴). p21 هم چنین از طریق اتصال به توالی پروموتور و فاکتورهای متصل شونده به پروموتور CDC2(cdk1) نیز موجب مهار رونویسی از آن می‌شود(۳۱). برای پیشرفت چرخه سلولی از مرحله G2 به M ، کمپلکس cyclin B/CDC2 (cdk1) باید فعال شود، ولی از طرف دیگر برای خروج از متافاز و ورود به آنافاز و در نهایت به پایان رساندن میتوز و شروع سیکلی دوباره، لازم است که این کمپلکس غیر فعال شود(۳۱). ATO از طریق آسیب به DNA و میکروتوبول‌ها و همین طور افزایش میزان cyclin B/CDC2 به وسیله ممانعت از تخریب شدن آن، موجب ورود زود هنگام به میتوز و عدم خروج از آن و در نتیجه توقف در مرحله میتوز و در نهایت آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی و فاجعه میتوزی می‌شود(۳۲، ۴).

بررسی میزان mRNA ژن p21 نشان داد که هم AZT تنها در غلظت ۵۰ ماکرومولار و هم ترکیب آن با ATO در غلظت ۱ ماکرومولار، موجب افزایش معنادار میزان mRNA این ژن در مقایسه با سلول های تیمار نشده(کنترل) می‌شود، ولی برعکس در سلول‌هایی که تنها با ATO تیمار شده‌اند در مقایسه با کنترل، میزان mRNA این پروتئین

Archive of SID
www.SID.ir

سرکوب می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است p21 در سلول‌های تیمار شده با ترکیب AZT/ATO ، مسؤول کاهش نسبی سلول‌های موجود در مرحله G2/M و در نتیجه کاهش نسبی آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی القا شده توسط ATO و همین طور افزایش نسبی سلول‌های موجود در مرحله G1 در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با ATO تنها، باشد. در مطالعه‌های بسیاری مطابق با نتایج ما نشان داده شده که p21 با توانایی که در مهار چرخه سلولی در نقطه کنترلی واقع در انتهای G1 دارد، به ویژه در هنگام روبه رویی با آزارهای ژنوتوکسیکی یا عوامل ناپایدارکننده میکروتوبول، می‌تواند سلول‌ها را از آپوپتوز محافظت کند زیرا یک چرخه سلولی فعال برای حس کردن این عوامل و آغاز آپوپتوز نیاز است(۳۵-۳۳، ۲۸).

سطوح افزایش یافته پروتئین p21 در سرطان‌های انسانی مختلفی از جمله پروستات، رحم، پستان، کارسینومای سلول‌های سنگفرشی(SCC)، مولتیپل میلوما(MM) و لوسمی میلوئیدی حاد(AML) مشاهده می‌شود و این افزایش بیان با درجه تومور و میزان تهاجم رابطه مثبت داشته و نشان‌دهنده یک پیش آگهی بد می‌باشد و میزان پاسخ‌دهی به شیمی درمانی و رادیوتراپی را متاثر می‌سازد(۳۶). ATO ممکن است درمان مفیدی برای سرطان‌های دیگر نیز باشد. در *in vitro* نشان داده شده که ATO در رده‌های لوسمی مثل AML و مولتیپل میلوما نیز آپوپتوز را القا می‌کند. ATO در رده‌های مشتق از تومورهای توپر (solid tumor) مانند نوروبلاستوما، هپاتو سلولار کارسینوما و هم‌چنین در سلول‌های سرطانی کولون، معده، پانکراس، پروستات و تخمدان نیز در محیط خارج از بدن، آپوپتوز را القا می‌کند. اما این سلول‌ها نسبت به دوزهای شیمی درمانی حساسیت کمتری نشان می‌دهند و به دوزهای بیشتری از ATO برای القای آپوپتوز در آن‌ها نیاز است. دوزهای بالای ATO به دلیل اثرات سمی بر روی بدن، استفاده از آن را در این بیماران محدود می‌کند(۴). با توجه به نتایج مطالعه حاضر و همین طور مطالعه تیلور و همکارانش در سال ۲۰۰۶ ، یکی از مکانیسم‌های مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر ATO ، می‌تواند افزایش بیان p21 باشد. p21 می‌تواند با ایجاد تغییر در اثر ATO بر روی چرخه سلولی و در نتیجه مهار آپوپتوز ناشی از توقف میتوزی، و هم چنین احتمالاً از طریق مکانیسم‌های آنتی‌آپوپتوزی دیگری همانند مهار پروتئین‌های مؤثر در آپوپتوز و افزایش بیان ژن‌های دارای فعالیت آنتی‌آپوپتوزی، از القای مرگ سلولی توسط ATO بکاهد(۲۸). بنابراین می‌توان از یک مهارکننده اختصاصی پروتئین p21 به همراه ATO در درمان بدخیمی‌هایی که دارای بیان بالایی از p21 و هم چنین حساسیت پایینی به آپوپتوز در اثر دوزهای شیمی درمانی این دارو هستند، استفاده کرد و اثر آن‌ها را در القای آپوپتوز مورد ارزیابی قرار داد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که AZT اثر آپوپتوزی ATO را احتمالا از طریق القای بیان p21 و گریز سلول از توقف در مرحله G2/M و افزایش توقف در مرحله G1 مهار می‌کند.

تشکر و قدردانی

از مدیریت و کارکنان محترم مرکز تحقیقات خون، آنکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی که در انجام این پژوهش ما را یاری دادند و اجازه کار در این مرکز را دادند، سپاسگزاری به عمل می‌آید.

www.SID.ir
Archive of SID

References:

1- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008; 111(5): 2505-15.
2- Emadi A, Gore SD. Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. Blood Rev 2010; 24(4-5): 191-9.
3- Sanz MA, Fenaux P, Lo Coco F; European APL Group of Experts. Arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. A review of current evidence. Haematologica 2005; 90(9): 1231-5.
4- Taylor BF, McNeely SC, Miller HL, Lehmann GM, McCabe MJ Jr, States JC. p53 suppression of arsenite-induced mitotic catastrophe is mediated by p21CIP1/WAF1. J Pharmacol Exp Ther 2006; 318(1): 142-51.
5- Zheng Y, Shi Y, Tian C, Jiang C, Jin H, Chen J, *et al*. Essential role of the voltage-dependent anion channel (VDAC) in mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome c release induced by arsenic trioxide. Oncogene 2004; 23(6): 1239-47.
6- Li J, Chen P, Sinogeeva N, Gorospe M, Wersto RP, Chrest FJ, *et al*. Arsenic trioxide promotes histone H3 phosphoacetylation at the chromatin of CASPASE-10 in acute promyelocytic leukemia cells. J Biol Chem 2002; 277(51): 49504-10.
7- Zhu J, Okumura H, Ohtake S, Nakamura S, Nakao S. Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia /lymphoma cell lines via the CD95/CD95L system. Oncol Rep 2003; 10(3): 705-9.
8- Pan XY, Chen GQ, Cai L, Buscemi S, Fu GH. Anion exchanger 2 mediates the action of arsenic trioxide. Br J Haematol 2006; 134(5): 491-9.
9- Mathieu J, Besançon F. Arsenic trioxide represses NF-kappaB activation and increases apoptosis in ATRA-treated APL cells. Ann N Y Acad Sci 2006; 1090: 203-8.
10- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, *et al*. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood 1996; 88(3): 1052-61.
11- Mandegary A, Hosseini R, Ghaffari SH, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghavamzadeh A, *et al*. The expression of p38, ERK1 and Bax proteins has increased during the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. Ann Oncol 2010; 21(9): 1884-90.
12- Bachleitner-Hofmann T, Gisslinger B, Grumbeck E, Gisslinger H. Arsenic trioxide and ascorbic acid: synergy with potential implications for the treatment of acute myeloid leukaemia? Br J Haematol 2001; 112(3): 783-6.
13- Gartenhaus RB, Prachand SN, Paniaqua M, Li Y, Gordon LI. Arsenic trioxide cytotoxicity in steroid and chemotherapy-resistant myeloma cell lines: enhancement of apoptosis by manipulation of cellular redox state. Clin Cancer Res 2002; 8(2): 566-72.
14- Diaz Z, Colombo M, Mann KK, Su H, Smith KN, Bohle DS, *et al*. Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines. Blood 2005; 105(3): 1237-45.
15- Zhang Y, Cao EH, Liang XQ, Qin JF. Increasing sensitivity to arsenic trioxide-induced apoptosis by altered telomere state. Eur J Pharmacol 2003; 474(2-3): 141-7.
16- Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. Clin Cancer Res 1998; 4(3): 693-6.
17- Humer J, Ferko B, Waltenberger A, Rapberger R, Pehamberger H, Muster T. Azidothymidine inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. Melanoma Res 2008; 18(5): 314-21.
18- Fang JL, Beland FA. Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes. Toxicol Sci 2009; 111(1): 120-30.
19- Fang JL, McGarrity LJ, Beland FA. Interference of cell cycle progression by zidovudine and lamivudine in NIH 3T 3cells. Mutagenesis 2009; 24(2): 133-41.
20- Falcone A, Danesi R, Dargenio F, Pfanner E, Brunetti I, Del Tacca M, *et al*. Intravenous azidothymidine with fluorouracil and leucovorin: a phase I-II study in previously untreated metastatic colorectal cancer patients. J Clin Oncol 1996; 14(3): 729-36.
21- Morgan RJ, Jr., Newman EM, Sowers L, Scanlon K, Harrison J ,Akman S, *et al*. Phase I study of cisdiamminedichloroplatinum in combination with azidothymidine in the treatment of patients with advanced malignancies. Cancer Chemother Pharmacol 2003; 51(6): 459-64.
22- Kurokawa M, Ghosh SK, Ramos JC, Mian AM, Toomey NL, Cabral L, *et al*. Azidothymidine inhibits NF-kappaB and induces Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt lymphoma. Blood 2005; 106(1): 235-40.
23- Ji HJ RS, Jeung HC, Yang SH, An SW, Chung HC. Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss. Breast Cancer Res Treat 2005; 93(3): 227-36.
24- Vivas-Mejía PE, Ozpolat B, Chen X, Lopez-Berestein G. Downregulation of the c-MYC target gene, peroxiredoxin III, contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. Int J Cancer 2009; 125(2): 264-75.
25- Sun YQ, Guo TK, Xi YM, Chen C, Wang J, Wang ZR. Effects of AZT and RNA-protein complex (FA-۲-b-beta) extracted from Liang Jin mushroom on apoptosis of gastric cancer cells. World J Gastroenterol 2007; 13(31): 4185-91.
26- Chiu DT DP. The toxicity of azidothymidine (AZT) on human and animal cells in culture at concentrations used for antiviral therapy. Genetica 1995; 95(1-3): 103-9.
27- Momeny M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Dehpour AR, Rahimi-Balaei M, Abdolazimi Y, *et al*. Arsenic trioxide induces apoptosis in NB-4, an acute promyelocytic leukemia cell line, through up-regulation of p73 via suppression of nuclear factor kappa B-mediated inhibition of p73 transcription and

Archive of SID
www.SID.ir

prevention of NF-kappaB-mediated induction of XIAP, cIAP2, BCL-XL and survivin. Med Oncol 2010; 27(3): 833-42.
28- Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nat Rev Cancer 2009; 9(6): 400-14.
29- 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.
30- Olivero OA, Tejera AM, Fernandez JJ, Taylor BJ, Das S, Divi RL, *et al*. Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells. Mutagenesis 2005; 20(2): 139-46.
31- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene 2004 ; 23(16): 2825-37.
32- Carney DA. Arsenic trioxide mechanisms of action-looking beyond acute promyelocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2008; 49(10): 1846-51.
33- Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J ,Kinzler K, Vogelstein B, *et al*. Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. Nat Med 1997; 3(9): 1034-6.
34- Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. Nature 1996 ; 381(6584): 713-6.
35- Bissonnette N, Hunting DJ. p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. Oncogene 1998; 16(26): 3461-9.
36- Liu S BW, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. Drug Resist Updat 2003; 6(4): 183-95.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2013; 10(2): 129-139

Original Article

Apoptotic effect of arsenic trioxide plus Azidothymidine on APL cell line (NB4) through P21 expression and cell cycle distribution changes

Hassani S.[1], Zaker F.[1], Zekri A.[2], Zaghal A.[3], Alimoghaddam A.[3], Ghavamzadeh A.[3], Ghaffari S.H.[3]

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

Abstract

Background and Objectives

Arsenic trioxide (ATO) is an active drug in treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), but has adverse effects on patients. In order to enhance antileukemic effectiveness and to reduce dosage of ATO, combinatorial effect of it with Azidothymidine (AZT) in apoptosis induction was evaluated on APL cell line (NB4).

Materials and Methods

The cells cultured and treated with 50 μM AZT and/or ATO for 48 hrs and then with apoptosis, cell cycle distribution, and P21 mRNA levels in comparison with untreated cells (control) were analyzed by flow cytometry and Real Time PCR, respectively.

Results

ATO led to induction of apoptosis (50.14% ± 7.12) in comparison with the control (3.9% ± 2.97) through the increment of the cell cycle arrest in G2/M. The apoptotic effect of ATO had been inhibited in cells treated with combination of AZT/ATO (24.35% ± 4.65). This inhibition was associated with the relative reduction of the cells in G2/M and relative increase of the cells in G1 phase. While ATO had suppressive effect on p21 gene expression (0.27±0.14), AZT (1.81 ± 0.21) and AZT/ATO (2.06 ± 0.32) induced it.

Conclusions

AZT attenuates ATO-caused apoptosis possibly through the induction of p21 expression and subsequent relative evasion from G2/M arrest and accumulation of cells in G1 phase.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, arsenic trioxide, Azidothymidine, Apoptosis

Received: 30 May 2012
Accepted: 7 Oct 2012

Correspondence: Ghaffari SH., PhD of Molecular Genetics. Associate Professor of Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Street. Postal code: 14111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902665; Fax: (+9821) 88004140
E-mail: *shghaffari@tums.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir