مقاله اصیل

ناقل حاوی پروموتور Oct4 برای القای مرگ سلولی به ردهٔ سلول سرطانی AGS

روشنک نجفی[1]، مجید صادقی‌زاده[2*]، سیدجواد مولی[3]

۱-دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی
Email: sadeghma@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۰۳

چکیده

هدف: برای ایجاد راه‌کارهای ژن درمانی مؤثرتر و ایمن‌تر به عنوان یک درمان واقع‌بینانه، پروموتورهای ویژهٔ توموری برای القای بیان ژن مورد نظر و نابودی سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. در این تحقیق برای اولین بار پروموتور Oct4 به عنوان یک پروموتور ویژهٔ توموری با کارایی بالا معرفی شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق پروموتور و تشدید کننده‌های Oct4 در ناقل گزارشگر pGL3 کنترل کلون شد و بیان لوسیفراز به عنوان یک ژن گزارشگر در ردهٔ سلولی گاستریک (AGS) بررسی شد. سپس از ناقل القا کنندهٔ مرگ که دارای پروموتور Oct4 و ژن TK (تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس) است به همراه پیش داروی گانسایکلوویر استفاده شد و پس از تیمار سلولی به کمک رنگ پروپیدیم آیوداید و کیت کانکسین، تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری برای بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و اثر این سیستم روی چرخهٔ سلولی انجام شد.

نتایج: بیان لوسیفراز تحت فعالیت پروموتور ژن Oct4 سه برابر پروموتور SV40 است. تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری نشان داد تحت پروموتور Oct4، سیستم HSV/TK/GCV ۸۶/۱۷ درصد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و درصد اندکی نکروز در ردهٔ سلولی گاستریک القا می‌کند. این سیستم چرخهٔ سلولی را در فاز S/G2 متوقف می‌سازد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که پروموتور Oct4 در ردهٔ سلولی سرطانی گاستریک فعال است و به علت بیان ژن Oct4 در تعدادی از رده‌های سلولی سرطانی و عدم بیان آن در سلول‌های طبیعی، پروموتور آن می‌تواند به عنوان یک پروموتور ویژهٔ توموری در انواع تومورها به‌کار رود.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی سرطانی، تیمیدین کیناز، گانسایکلوویر، لوسیفراز، Oct4

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۶۱-۷۲

مقدمه

نئوپلاسم (Neoplasm) بافتی است حاوی جمعیت هتروژنی از سلول‌هایی که ازنظر ویژگی‌های زیست‌شناختی متفاوت‌اند و پتانسیل خودبازسازی دارند [۱]. بر طبق مدل تکامل کلونال سلول‌های توموری سرطان از طریق تجمع تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها و انتخاب تدریجی کلون‌های موجود ایجاد می‌شوند. اغلب روش‌های درمانی مرسوم برای نابودی سلول‌های سرطانی، برپایهٔ این تئوری طراحی می‌شود [۲]. محدودیت این روش‌ها از جمله پیش‌آگهی ضعیف برای بیمارانی که در مراحل پیشرفتهٔ سرطان قرار دارند، این پیشنهاد

Archive of SID
www.SID.ir

را مطرح کرد که سلول‌های توموری حاوی جمعیتی از سلول‌ها هستند که مسئول آغاز رشد و گسترش تومور و نیز توانایی ایجاد متاستاز و عود مجدد تومور هستند. به دلیل شباهت‌هایی که میان این سلول‌ها و سلول‌های بنیادی وجود داشت، سلول‌های بنیادی سرطانی (Cancer Stem Cells: CSCs) نام‌گذاری شدند. این مدل ویژگی‌های زیر را برای CSCs تخمین می‌زند: ۱) خودبازتوانی ۲) هتروژن بودن، مانند پتانسیل تمایزیابی چندجهتی ۳) مقاومت به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis). به نظر می‌رسد که این ویژگی‌ها منجر به کاهش تأثیر درمان‌های مرسوم می‌شود که بیشتر روی سلول‌های توموری تمایز یافته یا در حال تمایز عمل می‌کند. جمعیت سلول‌های بنیادی تمایز نیافته، کسر اندکی از تودهٔ توموری را تشکیل می‌دهند. نظریه CSC تخمین می‌زند که این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پروژنیتور (سلول‌های پیشرو :Progenitor Cells) که تاحدی تمایز یافته‌اند و پتانسیل تکثیر محدود دارند، ایجاد شده‌اند [۳].

مطالعات اخیر بیانگر آن است که فاکتورهای رونویسی خاص سلول‌های بنیادی جنینی مانند Oct4 و Nanog نقش بسیار مهمی در پایداری عملکرد CSC ها ایفا می‌کند و برای مهار تکثیر این سلول‌ها اهداف بسیار مهمی به شمار می‌آید. به طور مثال Oct4 به عنوان یک نشانگر سلول‌های بنیادی جنینی در سرطان مثانه و سینه به میزان زیادی بیان می‌شود [٤، ٥]. اما در حال حاضر گزارش‌های اندکی مبنی بر استفاده از پروموتورهای ویژهٔ توموری برای از بین بردن CSC ها وجود دارد در نتیجه باید بررسی‌های جامع‌تری در این زمینه صورت پذیرد [6].

Oct4 عضوی از خانوادهٔ فاکتورهای رونویسی متصل شوندهٔ چهارتایی است و از طرفی بیان این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ نیز به تأیید رسیده است و نقشی حیاتی در حفظ خاصیت پرتوانی (Pluripotency) و بازتوانی آن‌ها ایفا می‌کند. این فاکتور در سطحی خاص، برای حفظ خاصیت خودبازسازی (Self-Renewal) سلول‌های بنیادی جنینی حیاتی است و هرگونه افزایش یا کاهش در بیان آن، سرنوشت سلول را تغییر می‌دهد و در روند ایجاد سرطان دخیل است. لازم به ذکراست که ویژگی‌های گفته شده ناشی از فعالیت Oct-4A است و Oct-4B در ایجاد خاصیت بنیادی دخیل نیست و به هنگام بررسی بیان این ژن در بافت‌های مختلف باید به این موضوع توجه داشت. تاکنون گزارشی مبنی بر بیان Oct4 در سلول‌های تمایز یافته ارایه نشده است [۷، ۸].

بسیاری از تحقیقات اخیر نشانگر بیان ژن OCT4 در سطح پروتئین در سرطان‌های مثانه، سینه، پانکراس و استئوسارکوما (Osteosarcoma) است. علاوه برآن؛ تای (Tai) و همکارانش حضور OCT4 را در چندین ردهٔ سلول‌های سرطانی از جمله سرطان کبد، کلیه، گاستریک و دهانهٔ رحم و استخوان تأیید کرده‌اند. این در حالیست که این ژن در سلول‌های طبیعی بیان نمی‌شود و همین امر آن را به عنوان یک کاندید بسیار مناسب معرفی می‌کند [۸-۱۱].

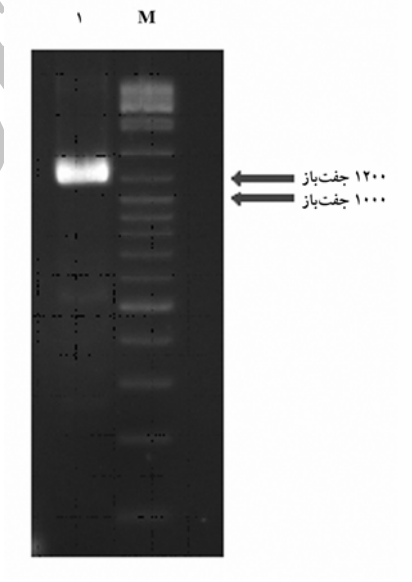
ژن‌درمانی از طریق نسخه‌برداری هدف‌گیری شده (Transcriptional Targeting) برپایهٔ به‌کارگیری پروموتورهای ویژهٔ توموری (Tumor Specific Promoters) یا ویژهٔ بافتی است که می‌تواند بیان ژن‌های درمانی را در یک بافت ناهمگون (هترولوگ) مستقیماً به تومور محدود کند. یک ژن‌درمانی مؤثر نیازمند بیان ژن مورد نظر در تومور و عدم بیان آن در بافت‌های طبیعی به‌ویژه کبد است. ترکیبی از این دو ویژگی می‌تواند منجر به افزایش شاخص درمانی و محدودیت سمیت ناقل‌ها و ترانس‌ژن‌ها در حالت درون بدنی (In vivo) شود. تاکنون بسیاری از پروموتورها به منظور ژن درمانی از طریق نسخه‌برداری هدف‌گیری شده مورد آزمایش قرار گرفته است. از آن جمله می‌توان به پروموتور آلفا- فتوپروتئین (Alpha Fetoprotein Promoter: AFP) برای کارسینومای کبدی، پروموتور آنتی‌ژن ویژهٔ پروستات (Prostate-Specific Antigen: PSA) برای سرطان پروستات و به تازگی پروموتور سیکلواکسیژناز-۲ (Cyclooxygenase 2: Cox-2) برای سرطان روده‌ای- معدی، پروموتور میدکاین (MidKine) برای تومور

Archive of SID
www.SID.ir

ویلمز (Wilms) یا نوروبلاستوما (Neuroblastoma) و پروموتور CXCR4 برای سرطان سینه و ملانوما (Melanoma) اشاره کرد [۱۱-۱۵].

استراتژی ژن‌درمانی سرطان از طریق نسخه‌برداری هدف‌گیری شده زیان‌هایی را نیز به دنبال دارد. به عنوان مثال پروموتور CXCR4 در بسیاری از سرطان‌های سینه افزایش بیان دارد، از طرفی ژن CXCR4 به طور قابل ملاحظه‌ای در انواع لوکوسیت‌ها از جمله در لنفوسیت‌های خون محیطی، مونوسیت‌ها، سلول‌های پیش‌ساز B و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود [۱۱].

هدف اصلی این تحقیق یافتن یک پروموتور ویژهٔ توموری



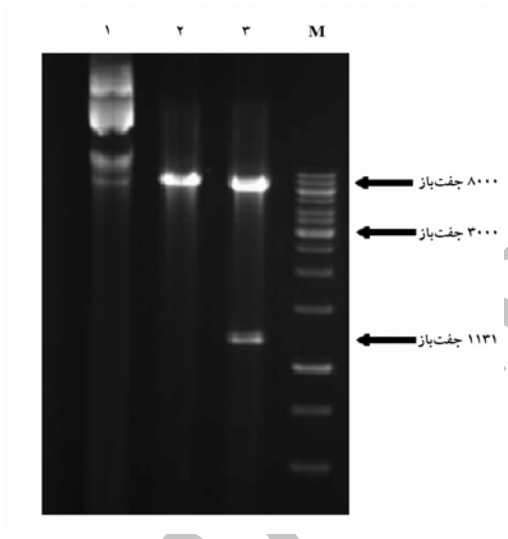
شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن TK/HSV روی ژل ۱ درصد؛ M) DNA نشانگر ۱ جفت‌بازی، ۱) محصول PCR ژن TK/HSV (۱۱۳۱ جفت‌بازی)

مواد و روش‌ها

ساخت پلاسمیدها

ژن تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس به منظور کلونینگ در ناقل pGL3-control با استفاده از آغازگرهای پیشرو

است که در طیف گسترده‌ای از تومورها بیان شود و درعین حال در بافت‌های طبیعی بیان نداشته باشد. تحقیقات اخیر نمایانگر آن است که ژن‌های فاکتورهای رونویسی مانند Nanog، OCT4 و SOX2 که در حفظ ویژگی‌های سلول‌های بنیادی نقش اساسی دارند، در سلول‌های سرطانی و CSC ها بیان بالایی دارند و در سلول‌های تمایز یافته و طبیعی بیان نمی‌شوند، کاندیدهای مناسبی به شمار می‌آیند [۱۶، ۱۷]. در تحقیق حاضر برای اولین بار پروموتور ژن Oct-4 به عنوان یک پروموتور ویژهٔ تومور به همراه سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی (Suicide Gene Therapy) در ردهٔ سلولی گاستریک AGS و ردهٔ سلولی طبیعی فیبروبلاستی جنین موش بررسی شده است.

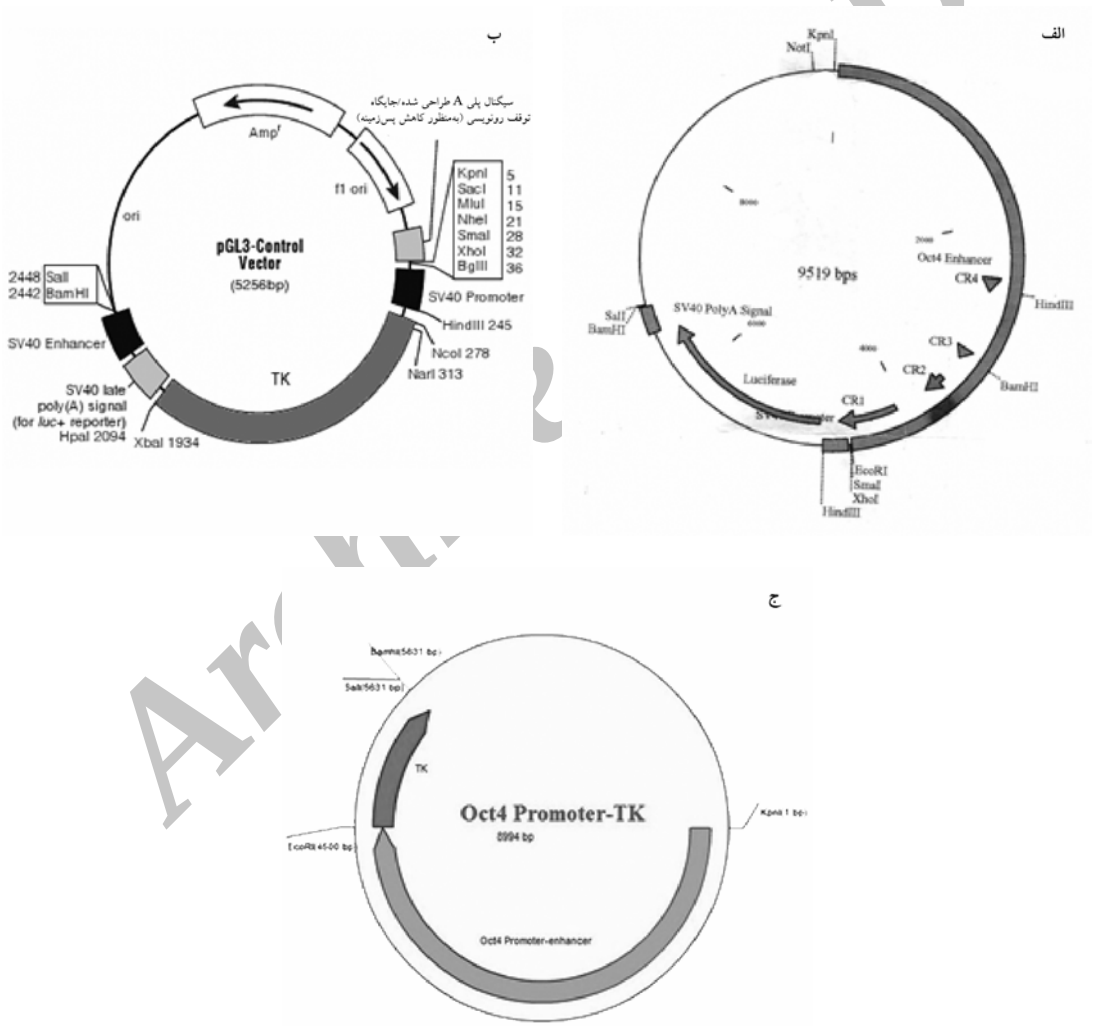


شکل ۲ تأیید درستی پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK با روش هضم تک آنزیمی و دو آنزیمی؛ M) DNA نشانگر، ۱) پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK هضم شده با آنزیم‌های *Eco*RI و *Bam*HI، ۲) پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK هضم شده با آنزیم *Bam*HI، ۳) پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK

5’ TACCCATGGCTTCGTACCCC 3’ (Forward) و پیرو 3’ 5’ CCGTCTAGATCAGTTAGCCT و با استفاده از پلاسمید حاوی این ژن که از انستیتو پاستور تهیه شده بود به عنوان نمونهٔ اصلی به کمک PCR تکثیر شد و محصول حاصل روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و باند اختصاصی

Archive of SID
www.SID.ir

۱۱۳۱ جفت‌بازی مشاهده شد (شکل ۱). محصول PCR پس از تکثیر و مشاهده روی ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل تخلیص شد. سپس در ناقل کلونینگ TA کلون شد (کیت کلونینگ InsTAclone™ PCR، شرکت Fermentas کانادا) و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III به ناقل حاوی پروموتور و افزاینده (Enhancer) ژن Oct4 ساب‌کلون شد (شکل ۲ و ۳ ج). از طرف دیگر ژن تیمیدین کیناز پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Nco*I و *Xba*I در ناحیهٔ پایین دست پروموتور SV40 ناقل pGL3 کلون شد (شکل ۳ ب). ناقل حاوی پروموتور- افزایندهٔ ژن Oct4 و نیز ژن گزارشگر لوسیفراز هدیهٔ ارزشمندی از جانب دکتر یوسوکه ماریکاوا (Yusuke Marikawa) بود (شکل ۳ الف). درستی توالی ژن تیمیدین کیناز با تعیین توالی این ژن توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) تأیید شد. لازم به ذکر است که کلیهٔ پلاسمیدهای مورد نیاز برای انتقال به سلول‌ها با کیت استخراج پلاسمید Endotoxin-free مربوط به شرکت Qiagene آلمان استخراج شد.



شکل ۳ نقشهٔ ناقل‌ها؛ الف) پلاسمید حاوی Oct4 promoter-enhancer/Luc (هدیه از از دکتر یوسوکه ماریکاوا) ب) پلاسمید pGL3 حاوی ژن TK، ج) پلاسمید حاوی پروموتور- افزایندهٔ ژن Oct4 و ژن TK

www.SID.ir

کشت ردهٔ سلولی

ردهٔ سلولی سرطانی AGS در محیط RPMI حاوی گلوکز بالا به همراه FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتومایسین (Streptomycin) کشت داده شد (تماماً از محصولات شرکت Invitrogen/GIBCO آمریکا). سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلول و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسیدکربن نگهداری شدند. پس از این‌که سلول‌ها به تراکم ۷۰ درصد رسیدند ناقل‌های مختلف به وسیلهٔ لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamin 2000) به آن‌ها ترانسفکت شد.

تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتور ژن Oct4

به منظور بررسی کارایی پروموتور Oct-4، ابتدا $10^4 \times 100$ سلول در فلاسک ٦ چاهکی کشت داده شد و پس از این‌که به تراکم بالای ۹۰ درصد رسیدند، سازه pGl3/Oct4/Luc و سازه pGL3-control به عنوان کنترل مثبت با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ شرکت Invitrogene (آمریکا) به رده‌های سلولی ذکر شده ترانسفکت شد. پس از ۳۰ ساعت میزان بیان لوسیفراز با دستگاه لومینومتر (Luminometer) بررسی و آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

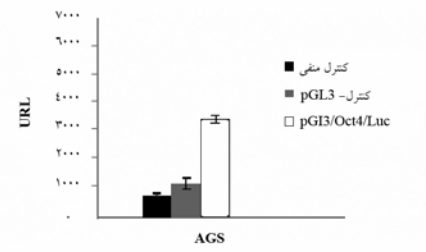
تشخیص مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

$10^4 \times 100$ سلول از ردهٔ سلولی AGS در پلیت‌های ٦ خانه کشت داده شدند، ٢٤ ساعت بعد پلاسمیدهای Oct-4 promoter/TK1 و pGL3/TK1 از طریق لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به آن‌ها ترانسفکت شد. در مرحلهٔ بعد پس از گذشت ۳۰ ساعت، داروی گانسایکلوویر (Ganciclovir) با غلظت‌های ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. ۷۲ ساعت بعد سلول‌ها پس از تریپسینه شدن با پروپیدیم آیوداید (Propidium Iodide: PI) و آنکسین V (Annexin V) رنگ‌آمیزی شدند تا میزان سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز و نیز آثار این سیستم روی چرخهٔ سلولی مشخص شود. در هر فلوسایتومتری ۱۰ هزار سلول بررسی شد (Becton–Dickinson) (آمریکا).

نتایج

تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتور Oct4 به وسیلهٔ ژن گزارشگر لوسیفراز

برای بررسی فعالیت پروموتور ژن Oct4 در ردهٔ سلولی سرطانی AGS، پلاسمید pGL3/Oct4promoter-enhancer و ناقل گزارشگر pGL3 که حاوی پروموتور SV40 است به ردهٔ سلولی مذکور ترانسفکت شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بیان لوسیفراز تحت فعالیت پروموتور ژن Oct4 ۳ برابر بیشتر از پروموتور SV40 است (نمودار ۱). فعالیت آنزیم لوسیفراز با آزمون T مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $P<$ ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.



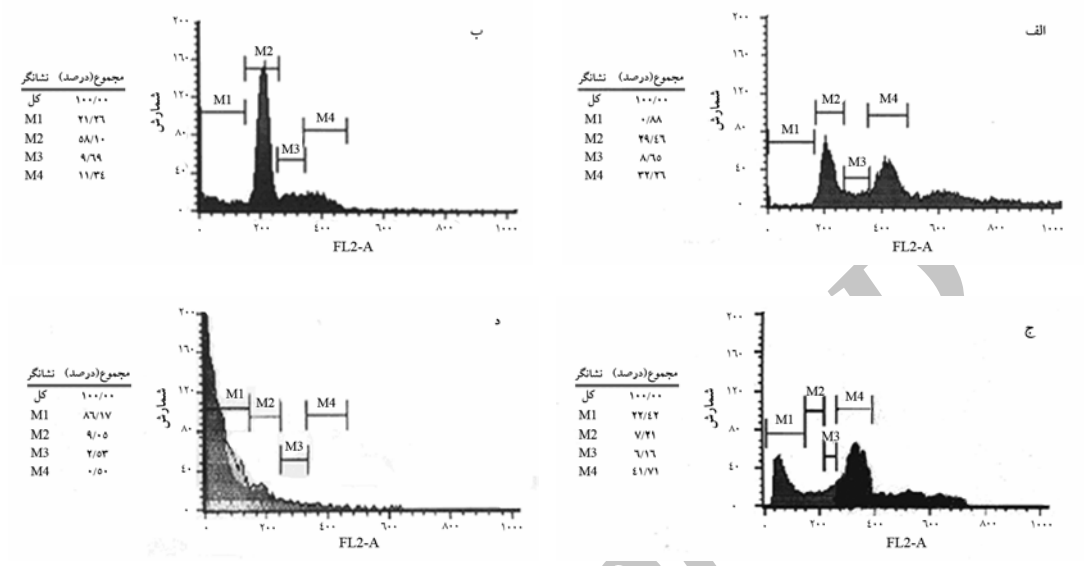
نمودار ۱ بررسی فعالیت لوسیفراز تحت پروموتور Oct4 در رده‌های سلولی AGS (کنترل منفی ردهٔ سلولی سرطانی بدون تیمار است.)

تجزیه و تحلیل چرخه سلولی رده‌های سلولی ترانسفکت شده با کمک روش فلوسیتومتری پس از تیمار با پیش داروی گانسایکلوویر

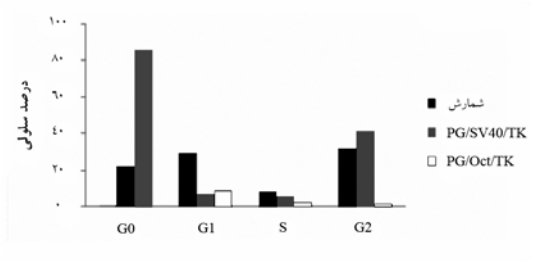
برای بررسی کارایی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط پروموتور ژن Oct4، دو کنترل استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ القا شده توسط پروموتور ژن Oct4 ٤ برابر پروموتور SV40 است (نمودار ۲). پس از ترانسفکت ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK1 و تیمار با

Archive of SID
www.SID.ir

گانسایکلوویر، کاهش قابل ملاحظه‌ای در درصد سلول‌های موجود در مرحله S و G2 چرخهٔ سلولی مشاهده شد که نشانگر اثر مهاری سیستم HSV-tk1/GCV بر مراحل S و G2 چرخهٔ سلولی بود (نمودار ۳).



نمودار ۲ هیستوگرام فلوسایتومتری از تأثیر تیمار سلول‌های AGS (با منشأ آدنوکارسینومای معده) با گانسایکلوویر بر فازهای مختلف چرخه سلولی؛ M1) سلول‌های موجود در فاز مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، M2) سلول‌های موجود در فاز G0/G1، M3) سلول‌های موجود در فاز S، M4) سلول‌های موجود در فاز G2، **الف)** سلول‌های سرطانی بدون تیمار (کنترل مثبت)، **ب)** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با pGL3/TK بدون تیمار با دارو، **ج)** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با pGL3/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر، **د)** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر



نمودار ۳ مقایسه درصد سلول‌های موجود در مراحل مختلف چرخهٔ سلولی ردهٔ سلولی AGS

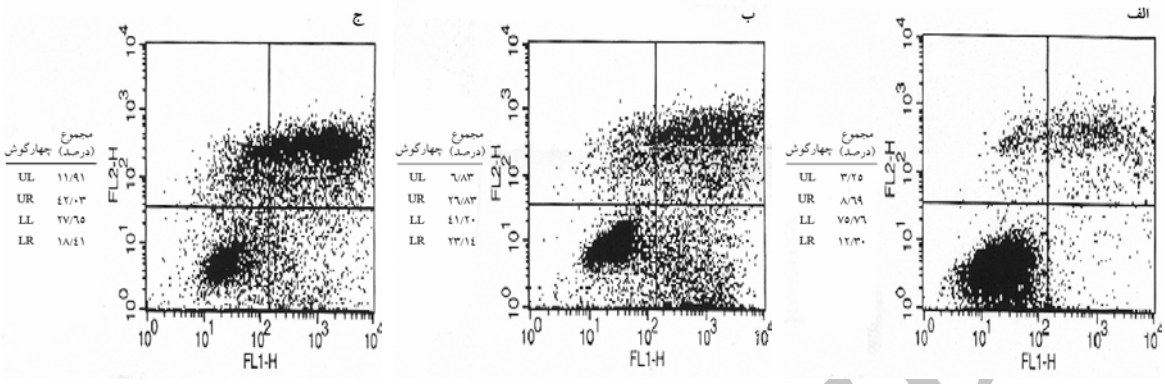
تجزیه و تحلیل مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نکروز به وسیلهٔ آنکسین V

با رنگ‌آمیزی Annexin V- FITC (Fluorescein Isothiocyanate) می‌توان فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در همان مراحل اولیه توسط روش ساده فلوسیتومتری سنجید. این روش میان سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptotic Cells) و سلول‌های دچار نکروز (Necrotic Cells) تمییز قایل نمی‌شود، به همین دلیل این روش به همراه رنگ‌آمیزی با PI استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های موجود در فاز تأخیری (Late) مرگ برنامه‌ریزی شده و سلول‌های دچار نکروز بیشتر از سلول‌های موجود در فاز زودهنگام (Early) مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و به ترتیب ۴۲ و ۱۸ درصد است (نمودار ٤).

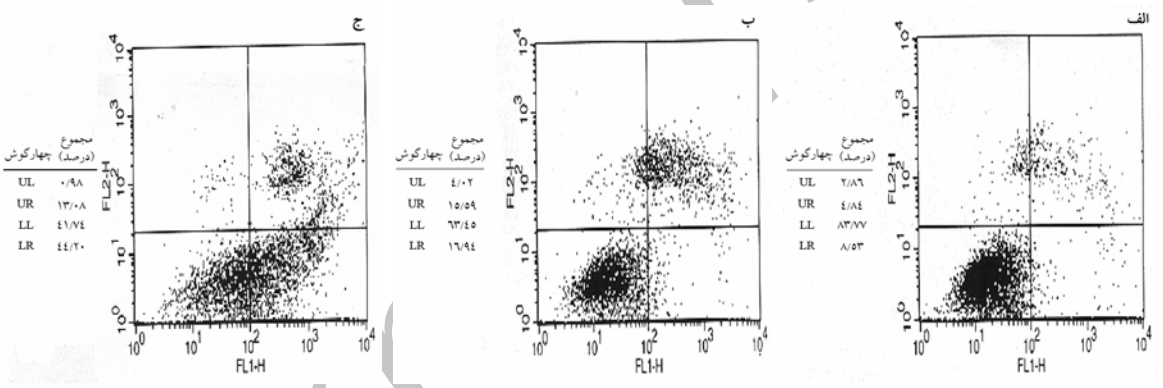
برای اطمینان از این موضوع که سازه حاوی ژن تیمیدین کیناز و پروموتور Oct4 در سلول‌های طبیعی فاقد اثر کشندگی هستند، آزمایش‌های انجام شده روی رده‌های سلول‌های سرطانی روی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش نیز به انجام رسید

Archive of SID
www.SID.ir

(نمودار ۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود حدود ۲۸ درصد از سلول‌ها در مراحل ابتدایی مرگ برنامه‌ریزی شده قرار دارند.



نمودار ٤ تجزیه و تحلیل مرگ سلولی سلول‌های ردهٔ AGS با استفاده از آنکسین V؛ **الف)** سلول‌های سرطانی بدون تیمار (کنترل منفی)، **ب)** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با pGL3/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر (کنترل مثبت)، **ج)** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر



نمودار ۵ تجزیه و تحلیل مرگ سلولی سلول‌های فیبروبلاست جنین موش با استفاده از آنکسین V

بحث

تاکنون روش‌های مختلفی برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده به سلول‌های سرطانی به‌کار گرفته شده است. از جملهٔ آن‌ها می‌توان به استفاده از پروموتور ژن hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) برای القای بیان ژن پیش‌آپوپتوزی Bax اشاره کرد که نتایج آن در مجلهٔ Nature به چاپ رسیده است. فعالیت این پروموتور هم در سلول‌های طبیعی و هم در سلول‌های بنیادی پیشرو بررسی شده، نتیجه بیانگر فعالیت بالای این پروموتور در سلول‌های سرطانی است در حالی که در سلول‌های +CD34 هماتوپوئیتیک پیشرو (Hematopoietic Progenitor) فعالیت آن ۱۰۰ بار کمتر است. در نهایت درصد مرگ برنامه‌ریزی شده القا شده به سلول‌های UV2237 (فیبروسارکومای موشی) از این طریق پس از ۷۲ ساعت، ۵۸/۲ درصد گزارش شده است [۱۹].

یکی دیگر از تحقیقات انجام شده، استفاده از RNAi (RNA interference) ویژهٔ تومووری بیان شده توسط پروموتور سوروایوین (Surviving) برای مهار eIF4E است که اخیراً در مجله Breast Cancer Research به چاپ رسیده است. در این

www.SID.ir

تحقیق پس از بررسی فعالیت ژن و پروتئین سورویوین و اطمینان از کارا بودن پروموتور آن در چهار ردهٔ سلولی کارسینومای سینه، از ناقل pSUPER.retro که دارای shRNA یی (short hairpin RNA) که پس از برش توسط دایسر (Dicer)، eIF4E mRNA را هدف قرار داده و از بین می‌برد، استفاده شده است. آزمون آنکسین V انجام شده نشان دهنده القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ۱/۷+۱۸/۳ درصد است [۲۰].

بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که ژن‌درمانی وابسته به خودکشی می‌تواند روش مؤثری برای نابودی سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) و درون بدنی (In vivo) باشد؛ با این وجود نتایج کارآزمایی‌های بالینی نیاز به افزایش کارایی این روش را نشان می‌دهد. از جمله استراتژی‌های جدیدی که برای افزایش اثر ضدتوموری این روش پیشنهاد شده است، ترکیب آن با داروهای مختلف یا با ژن درمانی است. در تحقیقی که توسط پارک (Park) و همکارانش در مجلهٔ Cancer Letter به چاپ رسید، ترکیبی از ژن درمانی سرطان و ژن‌درمانی وابسته به خودکشی با استفاده از اتصال shRNA ژن MDR (Multidrug Resistance) و سیستم HSVtk/GCV، و شیمی‌درمانی با دوکسوروبیسین (Doxorubicin) به‌کارگرفته شد که منجر به القای بیش از ۸۰ درصد مرگ سلولی به ردهٔ سلول‌های سرطانی کولون مورد مطالعه شد [۲۱]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در مواردی که ژن‌درمانی وابسته به خودکشی تنها با روش شیمی‌درمانی ترکیب می‌شود، tk-GCV به عنوان یک ضدمتابولیت ویژهٔ چرخهٔ سلولی برای القای اثر سمی خود با داروهایی که اثر خود را به طور خاص روی چرخهٔ سلولی اعمال نمی‌کنند به رقابت می‌پردازد؛ در نتیجه افزایش محسوسی در کارایی روش‌های درمانی ترکیبی مشاهده نمی‌شود [۲۱، ۲۲].

در تحقیق حاضر از ژن HSV tk به همراه پروموتور ویژهٔ توموری Oct4 استفاده شد. پس از ترانسفکت پلاسمیدهای مورد نظر به ردهٔ سلولی سرطانی گاستریک، این سلول‌ها به مدت سه روز با غلظت‌های مختلف داروی گانسایکلوویر تیمار شدند. سپس به منظور بررسی مرگ سلولی از روش فلوسیتومتری و کیت تشخیصی آنکسین V استفاده شد.

نتایج حاصل از بررسی چرخهٔ سلولی در ردهٔ سلولی AGS نشانگر آن است که سیستم HSVtk/GCV با القای توقف چرخهٔ سلولی در مرحله S/G2 منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود که بسته به میزان بیان ژن کانکسین در هر یک از رده‌های سلولی مذکور کارایی این سیستم متفاوت خواهد بود [۲۳]. هرچه بیان ژن Oct4 بیشتر باشد میزان بیان کانکسین کاهش می‌یابد، در نتیجه اگرچه بیان ژن tk در سلول‌ها تحت این پروموتور افزایش می‌یابد اما به دلیل کاهش GJICها (Gap Junctional Intercellular Communication)، مرگ سلولی کمتری مشاهده می‌شود. مرگ سلولی القا شده از طریق این سیستم در ردهٔ سلولی AGS هم از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده و هم از طریق نکروز است با تأکید بر این که مرگ برنامه‌ریزی شده نقش غالب را داراست.

در تحقیق حاضر برای اولین بار از پروموتور Oct4 به همراه سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی HSVtk/GCV استفاده شد، ضمن این که برای اولین بار فعالیت این پروموتور در ردهٔ سلولی سرطانی AGS توسط سیستم ژن گزارشگر لوسیفراز (Luciferase Gene Reporter Assay) بررسی شد. پس از تیمار رده‌های سلولی مذکور با گانسایکلوویر و تجزیه و تحلیل مرگ سلولی با استفاده از روش فلوسیتومتری و کیت تشخیصی آنکسین V، ۸۶/۱۷ درصد از سلول‌های ردهٔ سلولی سرطانی AGS دچار مرگ برنامه‌ریزی شده شدند. درصد بالای مرگ سلولی در ردهٔ سلولی سرطانی AGS به علت بیان بالای کانکسین و در نتیجه افزایش اثرسیستم مجاورتی و بهبود سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی است. بررسی‌های نهایی نشان داد که سیستم HSVtk/GCV با القای توقف چرخهٔ سلولی در مرحله S/G2 منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود و مرگ سلولی حاصل از دو طریق مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز رخ می‌دهد [۲۴].

بیان ژن Oct4 در بسیاری از انواع سرطان‌ها و نیز افزایش بیان آن در سلول‌های بنیادی سرطانی و عدم بیان آن در سلول‌های طبیعی، پروموتور آن را کاندید مناسبی برای استفاده به عنوان یک پروموتور ویژهٔ توموری می‌گرداند؛ زیرا عامل عود مجدد سرطان پس از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، سلول‌های

Archive of SID
www.SID.ir

بنیادی سرطانی هستند که می‌توان با استفاده از پروموتور این ژن و سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی HSVtk/GCV به طور خاص این سلول‌ها را هدف قرار داد و راهی برای ریشه‌کن کردن این بیماری یافت [٤، ٢٥-٣٢].

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین شبکه سلول‌های بنیادی کشور و دانشگاه تربیت مدرس که کلیهٔ هزینه‌های این طرح را تأمین نموده‌اند، ابراز می‌دارند. همچنین از خانم حیات در بخش تحقیقات مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام آزمایش‌های فلوسایتومتری ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌شود. ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK با شمارهٔ ۳۹۰۱۱۰۷۷۷/۷۵۲۹۷ در سازمان مالکیت‌های صنعتی ثبت اسناد و املاک کشور به ثبت رسیده است.

منابع

[1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414(6859): 105-11.

[2] Clarke MF, Becker MW. Stem cells: the real culprits in cancer? Sci Am 2006; 295(1): 52-9.

[3] Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. Stem Cells 2007; 25(3): 707-11.

[4] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. Int J Cancer 2007; 120(7): 1598-602.

[5] Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. Cancer 2005; 104(10): 2255-65.

[6] Bauerschmitz GJ, Ranki T, Kangasniemi L, Ribacka C, Eriksson M, Porten M, Herrmann I, Ristimäki A, Virkkunen P, Tarkkanen M, Hakkarainen T, Kanerva A, Rein D, Pesonen S, Hemminki A. Tissue-specific promoters active in CD44+CD24-/low breast cancer cells. Cancer Res 2008; 68(14): 5533-9.

[7] Ashok KA, Reddy KVR. Oct-4: More than a pluripotent marker? Yakhteh Med J 2009; 11(1): 1-12.

[8] Asadi MH, Mowla SJ, Fathi F, Aleyasin A, Asadzadeh J, Atlasi Y. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. Int J Cancer 2011; 128(11): 2645-52.

[9] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis 2005; 26(2): 495-502.

[10] Minucci S, Botquin V, Yeom YI, Dey A, Sylvester I, Zand DJ, Ohbo K, Ozato K, Scholer HR. Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo. EMBO J 1996; 15(4): 888-99.

[11] Levings PP, McGarry SV, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC, Steindler DA, Gibbs CP. Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. Cancer Res 2009; 69(14): 5648-55.

[12] Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer

Archive of SID
www.SID.ir

by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(7-8): 554-71.

[13] Nettelbeck DM, Jérôme V, Müller R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. Trends Genet 2000; 16(4): 174-81.

[14] Lee SE, Jin RJ, Lee SG, Yoon SJ, Park MS, Heo DS, Choi H. Development of a new plasmid vector with PSA-promoter and enhancer expressing tissue-specificity in prostate carcinoma cell lines. Anticancer Res 2000; 20(1A): 417-22.

[15] Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y, Grizzle WE, Curiel DT. Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. Mol Ther 2001; 3(3): 385-94.

[16] Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Wang M, Takayama K, Matsubara S, Muramatsu T, Curiel DT. A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. Cancer Res 2001; 61(21): 7882-8.

[17] Liu J, Leina M, Yigang W, Yuan LX, Qijun Q. A novel strategy for cancer treatment: targeting cancer stem cell. Chin Sci Bull 2008; 53(12): 1777-83.

[18] Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. Mol Vis 2007; 13: 823-32.

[19] Gu J, Andreeff M, Roth JA, Fang B. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. Gene Ther 2002; 9(1): 30-7.

[20] Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Kaliberova L, Liu B, Rivera AA, Nettelbeck DM, Mahasreshti PJ, Leath CA, Barker S, Yamaoto M, Li F, Alvarez RD, Curiel DT. Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter. Cancer Gene Ther 2004; 11(4): 256-62.

[21] Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. Cancer Res 1993; 53(21): 5274-83.

[22] Cao D, Pizzorno G. Uridine phosophorylase: an important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation. Drugs Today (Barc) 2004; 40(5): 431-43.

[23] Wei SJ, Chao Y, Hung YM, Lin WC, Yang DM, Shih YL, Ch'ang LY, Whang-Peng J, Yang WK. S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. Exp Cell Res 1998; 241(1): 66-75.

[24] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy. Mol Aspects Med 2007; 28(1): 4-41.

[25] Kim RJ, Nam JS. OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. Lab Anim Res 2011; 27(2): 147-52.

[26] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML,

Archive of SID

www.SID.ir

Lee YY, Ku HH, Chiou SH. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. PLoS One 2008; 3(7): e2637.

[27] Tasciotti E, Giacca M. Fusion of the human immunodeficiency virus type 1 tat protein transduction domain to thymidine kinase increases bystander effect and induces enhanced tumor killing in vivo. Hum Gene Ther 2005; 16(12): 1389-403.

[28] Chang CC. Recent translational research: stem cells as the roots of breast cancer. Breast Cancer Res 2006; 8(1): 103.

[29] Du Z, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, Cao X, Ling EA, Hao A. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. Glia 2009; 57(7): 724-33.

[30] Kasper S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. Stem Cell Rev 2008; 4(3): 193-201.

[31] Ailles L, Prince M. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. Methods Mol Biol 2009; 568: 175-93.

[32] Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AL. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. PLoS One 2008; 3(6): e2428.

Archive of SID

www.SID.ir