Archive of SID

کومش- جلد ۱۹، شماره ۱ (پیاپی ۶۵)، زمستان ۱۳۹۵

# [illegible] اثر داروی [illegible]برین [illegible]ر بیان ژن Survivin [illegible]ر بیماران [illegible]سمی [illegible]نوسیتی [illegible]من

حبیب جعفری‌نژاد [۱و۲](M.Sc)، نیلوفر غنی‌زاده [۱و۲](M.Sc)، فرحناز قهرمانفرد [۳](M.D)، مهدی براتی [۱و۲](M.Sc)، احسان منوچهری دولابی [۱و۲](M.Sc)، پرویز کوخایی [۱و۴*](Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات سرطان، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه پزشکی داخلی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۴- آزمایشگاه ایمونولوژی و ژن‌درمانی، مرکز سرطان کارولینسکا، بیمارستان دانشگاه کارولینسکا، استکهلم، سوئد

## چکیده

[illegible]: لوسمی [illegible]نوسیتی [illegible]من یکی [illegible] سرطان‌های [illegible] که با تکثیر بیش [illegible] سلول‌های B [illegible]راه می‌باشد این بیماری [illegible] تقریبی [illegible] مردان بالای ۵۰ سال شایع‌تر است CLL [illegible] آپوپتوز در سلول‌های B [illegible] هدف ما در این [illegible] بررسی بیان [illegible] پروتئین Survivin [illegible] توان [illegible] پروتئین [illegible] آپوپتوز در [illegible] لول‌های تک‌هسته‌ای [illegible] محیطی بیماران CLL [illegible] [illegible] تحت تأثیر داروی [illegible]برین [illegible] محیط In vitro [illegible]ت.

[illegible] و روش‌ها: در این [illegible] [illegible] به لوسمی [illegible]نوسیتی [illegible]من به‌[illegible] گروه مورد [illegible] و ۶ [illegible] سالم [illegible] لوسمی [illegible]نوسیتی [illegible] شده با سن بیماران به‌[illegible] کنترل موردبررسی [illegible] بعد از اخذ [illegible] افراد، سلول‌های تک‌هسته‌ای [illegible] محیطی [illegible] فایکول [illegible]اسازی [illegible] وه همراه با داروی [illegible]برین (۲۵ میکرومولار) [illegible] دارو در محیط [illegible] داده شدند؛ و بعد از ۴۸ [illegible] بیان ژن Survivin [illegible] دستگاه Real time PCR [illegible] [illegible] سایز گرین [illegible] بررسی [illegible] گرفت.

[illegible]: نتایج [illegible] نمود که سطح بیان ژن Survivin در بیماران [illegible] به CLL [illegible] تأثیر داروی [illegible]برین به‌[illegible] قابل‌توجهی [illegible] دارو (کنترل) پایین‌تر است (P<۰/۰۵) به‌صورتی‌که [illegible] بیان ژن Survivin [illegible] [illegible] تحت تأثیر داروی [illegible]برین [illegible] (کنترل) تفاوت معنی‌داری [illegible] نداد (P>۰/۰۵).

[illegible]: نظر می‌رسد که یکی [illegible] مسیرهای [illegible] توسط داروی [illegible]برین [illegible] کاهش بیان ژن Survivin [illegible] کاهش بیان mRNA این [illegible] پروتئین [illegible] در سلول‌های [illegible] سرطانی [illegible]سمی [illegible]نوسیتی [illegible] است درحالی‌که این [illegible] بر روی [illegible] لول‌های [illegible] [illegible] تأثیر حساسی [illegible] است. [illegible] آن جایی‌که داروی [illegible]برین [illegible] بعضی [illegible] در کلینیک [illegible] استفاده است باید [illegible] داشت این نتایج می‌تواند به‌عنوان یک گزینه [illegible]مانی [illegible] CLL نیز [illegible] شود.

واژه‌های کلیدی: لوسمی [illegible]من [illegible]نوسیتی، Survivn، [illegible]ین، Real-Time Polymerase Chain Reaction

## مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) یک بیماری هتروژن با سیر بالینی بسیار متغیر است [۱]. این بیماری یکی از شایع‌ترین انواع لوسمی در کشورهای غربی است. ۹۰ درصد بیماران CLL در گروه سنی بالاتر از ۵۰ سال قرار دارند و مردان نسبت به زنان بیش‌تر تحت تأثیر قرار می‌گیرند. حدود

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۳۶۲

Email: parviz.kokhaei@ki.se

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۳



www.SID.ir

Archive of SID



۴۰ تا ۶۰ درصد از بیماران مبتلا به CLL بدون علامت هستند و به‌طور تصادفی تشخیص داده می‌شوند [۳،۲]. این بیماری با تکثیر و تجمع سلول‌های B بالغ +CD5 در اندام‌های لنفاوی، مغز استخوان و خون محیطی همراه می‌باشد و تقریباً بیش‌تر سلول‌های سرطانی افراد CLL در اوایل فاز G0 و G1 از چرخه‌ی سلولی متوقف می‌شوند [۴،۵]. نقص در مسیر آپوپتوز منجر به گسترش سلول‌های B در بیماری CLL می‌شود [۷،۶]. آپوپتوز که به‌عنوان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول تعریف شده است از طریق کاسپازها و سیستئین پروتئازها راه‌اندازی شده و به‌واسطه یک سری از پروتئین‌های فعال‌کننده و مهارکننده آپوپتوز تنظیم می‌شود. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 تنظیم‌کننده‌های اصلی مسیر آپوپتوز وابسته به میتوکندری می‌باشند [۸]. تعدادی از این پروتئین‌ها در بیماران CLLافزایش بیان داشته که با مهار آپوپتوز و پاسخ ضعیف به داروهای شیمی‌درمانی ارتباط دارند [۱۰،۹]. به نظر می‌رسد افزایش بیان پروتئین‌های مهارکننده اپوپتوز (IAPs) در بیماری‌زایی انواع سرطان‌های انسانی ازجمله لوسمی‌ها نقش اساسی داشته باشد. این پروتئین‌ها که اخیراً کشف شده‌اند به‌عنوان پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز مطرح می‌باشند که در تنظیم فعالیت کاسپازها و هم‌چنین در تنظیم چرخه‌ی سلولی و انتقال سیگنال‌های درون‌سلولی نقش دارند [۱۲،۱۱]. خانواده IAPs دارای ۸ عضو می‌باشد که هر پروتئین آن دارای دومین‌های تکراری Baculuviral IAP Repeat (BIR) است که به آن‌ها اجازه می‌دهد به کاسپازها متصل شده و فعالیت آن‌ها را مهار کنند. اعضا این خانواده عبارت‌اند از cIAP1 و cIAP2 (cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2)، XIAP (X-chromosome binding IAP)، livin ،ILP-2 (IAP–like protein 2)، NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein)، survivin و BRUCE (Apollon) [12-14]. [۱۲-۱۴]. Survivin یکی از اعضا خانواده پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز است که منجر به مهار آپوپتوز و تنظیم تقسیم سلولی می‌شود [۱۵]. این پروتئین توجه زیادی از محققین را به خود جلب کرده است به این دلیل که به‌عنوان یک Tumor-associated antigen مطرح شده است و در اکثر سرطان‌های انسانی با منشأ سلول اپی‌تلیالی و خون‌ساز افزایش می‌یابد [۱۷،۱۶].

اخیراً تعدادی از مشتقات گیاهی به‌طور موفقیت‌آمیزی در درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بربرین یک ایزوکوئینولین آلکالوئید متعلق به رده ساختاری پروتوبربرین‌ها است که به‌طور گسترده‌ای مورد تحقیق قرار گرفته و مشخص شده است که فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی متنوعی ازجمله اثرات ضد میکروبی، ضد کرمی، ضد سرطانی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد [۱۸-۲۱]. بربرین موجب القاء آپوپتوز، مهار تکثیر سلولی، توقف در فرایند رگ‌زایی و تأخیر در شروع متاستاز می‌شود [۲۲]. اخیراً تحقیقاتی صورت گرفت که تأثیر ضد توموری داروی بربرین را در رده سلول سرطانی تخمدان(SKOV3) مورد بررسی قرار دادند. نتایج به‌دست آمده حاکی از آن بود که داروی بربرین موجب مهار تکثیر سلول‌های سرطانی از طریق کاهش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک BCL2 و افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک BAXمی‌شود [۲۳]. داروی بربرین هم‌چنین منجر به القاء آپوپتوز در رده سلولی سرطانی پستان (MCF-7) از طریق کاهش بیان ژن BCL2 و افزایش بیان ژن‌های BAX و CytC می‌شود [۲۴].

علی‌رغم وجود داروهای متعدد برای بیماری لوسمی لنفوسیتی مزمن، این بیماری هم‌چنان جزء بیماری‌های غیر قابل درمان تلقی می‌شود [۲۵]. القاء آپوپتوز یکی از استراتژی‌های درمانی به‌خصوص در درمان بیماری CLL است و بدین لحاظ استفاده از داروی بربرین در ایجاد کاهش عمل‌کرد ژن Survivin و افزایش احتمال وقوع القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در این مطالعه طراحی و اجرا شد. با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با استفاده از این دارو و تأثیر آن بر القاء آپوپتوز سلول‌های توموری این نوع لوسمی انجام نگرفته است، نتایج این مطالعه می‌تواند مبنای



www.SID.ir

Archive of SID



پژوهش‌های بیش‌تر در مورد مکانیسم اثر این دارو در بدخیمی هماتولوژیک لوسمی لنفوسیتی مزمن باشد.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: نمونه‌های بیماران که مطابق دستورالعمل iwCLL، بیماری آن‌ها تشخیص و با معیارهای تأییدی تأیید شده بود، بعد از اخذ رضایت آگاهانه تهیه گردید. ازجمله ویژگی‌های این بیماران محدوده‌ی سنی ۷۰-۴۰ سال با محدوده‌ی لکوسیتی ۱۰۳×۱۰/۱-۶۰/۵ و دارای ۹۰-۶۰ درصد لنفوسیت بود. تعداد ۱۲ نمونه بیمار و تعداد ۶ نمونه کنترل منطبق با سن بیمار جمع‌آوری و به دانشگاه علوم پزشکی سمنان منتقل گردید. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در فازهای اولیه و متوسط بیماری بر اساس رتبه‌بندی سیستم Rai و سیستم Binet قرار گرفته بودند و بیماری CLL در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از نوع غیر پیش‌رونده بود [۲۷،۲۶]. تشخیص بر مبنای علائم بالینی و آزمایشگاهی انجام و با تست فلوسایتومتری تأیید شد [۲۸].

جداسازی و کشت: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به روش فایکول جدا گردید و در ۲ گروه در پلیت‌های محیط کشت ۶ خانه همراه با داروی بربرین ۲۵ میکرومولار کشت داده شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌ها جمع‌آوری گردید. دوز اپتیمم ۲۵ میکرومولار با توجه به مطالعات پیشین که در این دانشگاه تعیین شده بود، مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج **RNA** و ساخت **cDNA**: تعداد $۱۰^۵ \times ۳۵$ سلول جمع‌آوری شده، RNA سلول‌ها به روش Trizol استخراج گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد و کمیت RNA با مشاهده باندهای 18s, 28s تأیید گردید. ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA High capacity cDNA Rverse Kit, Lot (number: 1404194) و طبق دستور شرکت سازنده انجام شد [۲۹].

بررسی بیان ژن **Survivin**: برای بررسی بیان ژن هدف Survivin و ژن کنترل داخلی GAPDH از پرایمر اختصاصی برای هر ژن استفاده شد و طراحی پرایمر صورت گرفت و جهت اطمینان از یکتا بودن محل اتصال پرایمرها در مورد تمامی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار BLAST در ژنوم انسان جستجو انجام شد. از دستگاه Real-Time PCR (ABI 7900HT, 96 wells, SYBR Green) جهت به‌دست آوردن نتایج استفاده گردید. با استفاده از گرادیان PCR، دمای مناسب برای اتصال پرایمر ۵۶ درجه سانتی‌گراد تعیین و انجام شد.

## نتایج

نتایج کیفیت RNA استخراج‌شده به روش الکتروفورز حاکی از خلوص قابل‌قبول و عاری از آلودگی‌های فنلی و EDTA بود. نتایج الکتروفورز cDNA تولیدشده نشان می‌دهد که cDNA از کمیت و کیفیت مناسبی برای Real-Time PCR برخوردار است.

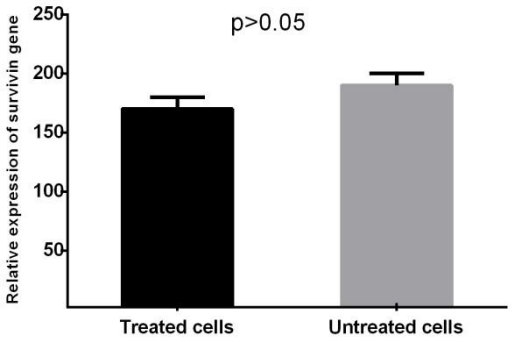
نتایج و منحنی تکثیر ژن‌های Survivn و GAPDH با استفاده از Real-Time PCR نشان می‌دهد که تکثیر به خوبی صورت گرفته است. نتایج تست Real-Tim PCR با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. آنالیز داده‌ها با Paired-T test انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که سطح بیان ژن survivin در بیماران مبتلا به CLL تحت تأثیر داروی بربرین به‌طور قابل‌توجهی نسبت به گروه بدون دارو (کنترل) پایین‌تر است ($P<۰/۰۵$)؛ با وجود این، سطح بیان ژن Survivin در افراد سالم تحت تأثیر داروی بربرین و بدون دارو (کنترل) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>۰/۰۵$) (شکل ۱و۲).



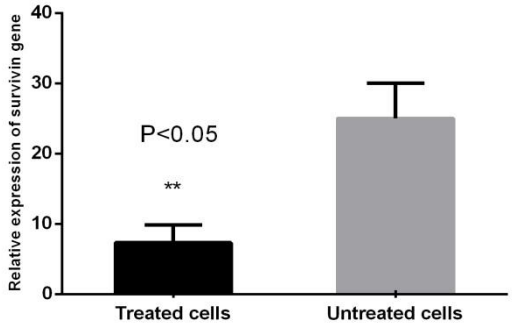
www.SID.ir

Archive of SID






شکل ۱. بیان ژن Survivin در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بیماران CLL. سلول‌های درمان شده با اختلاف معناداری نسبت به سلول‌های درمان‌نشده میزان پایین‌تری از ژن Survivn را بیان کردند. (n=12).




شکل ۲. بیان ژن Survivin در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی افراد سالم. بیان ژن Survivin در سلول‌های درمان شده و درمان‌نشده با داروی بربرین در افراد سالم اختلاف معناداری را نشان نداد. (n=6).

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای که توسط Daniel Escuin و Rafael Rosell صورت گرفت، بیان ژن Survivin را در۸۳ نمونه سلول سرطانی غیر کوچک ریه (Non–small-cell) مورد ارزیابی قراردادند و مشاهده کردند که ژن Survivin در ۷۱ (۸۲درصد) نمونه سرطانی بیان گردیده و این در حالی است که این ژن تنها در ۱۰ (۱۲درصد) نمونه سلول‌های سالم بیان شده است. در پی این مطالعات نتیجه گرفتند که ارزیابی رونوشت‌های این ژن می‌تواند به‌عنوان یک پیش‌آگهی و یک برآورد درمانی در سرطان ریه مطرح باشد [۳۰]. ژن Survivin در اکثر سلول‌های سرطانی ازجمله لوسمی سلول T بالغین [۳۱]، لوسمی لنفوسیتی حاد (ALL)، لوسمی میلوئیدی حاد [۲۷]، لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) افزایش بیان دارد [۳۳،۳۲]. پژوهشی در سال ۲۰۱۳ توسط Novia .K.Y.VIP انجام شد که بیان ژن Survivin را تحت تأثیر داروی بربرین در رده سلول سرطانی کبدی (WRL68،Huh7) مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که داروی بربرین منجر به آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود. در این سلول‌های آپوپتوز شده بیان ژن Survivin کاهش پیدا کرده بود [۳۴].

در مطالعه‌ای دیگر، تأثیر داروهای کورکومین، بربرین و کوئرستین در بیان ژن‌های Survivin و STAT3 در سرطان معده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که این داروها منجر به کاهش بیان ژن‌های مورد نظر شده و هم‌چنین داروی بربرین در ترکیب با داروی ۵- فلوئوروراوراسیل باعث مهار سینژیک در بیان ژن‌های Survivin و STAT3 می‌گردد که نهایتاً افزایش مرگ سلول‌های سرطانی را به همراه خواهد داشت [۳۵]. مهارکننده پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (HSP90) دارای پتانسیل درمانی بالایی در سرطان کولورکتال می‌باشد. این مهارکننده در ترکیب با داروی بربرین موجب اپوپتوز و مهار تکثیر سلول سرطانی کلورکتال شده و نیز موجب کاهش بیان ژن Survivin می‌گردد [۳۶]. بر طبق یافته‌های به‌دست آمده در این تحقیق، سطح بیان ژن Survivin در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن تحت تأثیر داروی بربرین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با افراد سالم پایین بوده است. به نظر می‌رسد که داروی بربرین با کاهش بیان ژن Survivin باعث القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی لوسمی لنفوسیتی مزمن شده است در حالی‌که این دارو بر روی سلول‌های افراد نرمال تأثیر محسوسی نداشته است. ازآن‌جایی‌که این ژن در بیش‌تر سرطان‌های انسانی افزایش بیان داشته و تغییر در بیان این ژن بر روند آپوپتوز اثرگذار است، می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی مهم برای درمان سرطان در نظر گرفته شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده بیان سایر ژن‌های مهارکننده آپوپتوز تحت تأثیر این دارو مورد بررسی قرار گیرد.



www.SID.ir

Archive of SID



## تشکر و قدردانی

تشکر از حمایت معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان که ما را در انجام پژوهش فوق و تدوین این مقاله پشتیبانی نمودند.

## منابع

[1] Rai KR, Wasil T, Iqbal U, Driscoll N, Patel D, Janson D, Mehrotra B. Clinical staging and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2004; 18: 795-805.

[2] Shanshal M, Haddad RY. Chronic lymphocytic leukemia. Dis Mon 2012; 58: 153-167.

[3] Moshfeghi K, Mosayebi G. Therapeutic effects of fludarabine-cyclophosphamide combined therapy in Iranian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Koomesh 2015; 16: Pe202-Pe206.

[4] Gale R, Foon K, editors. Biology of chronic lymphocytic leukemia. Seminars in hematology; 1987.

[5] Palma M. Immunological and molecular studies for the development of vaccine therapy for chronic lymphocytic leukemia: Institutionen för onkologi-patologi/Department of Oncology-Pathology; 2010.

[6] Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B- chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. Br J Haematol 1989; 71: 343-350.

[7] Kokhaei P. B-cell chronic lymphocyte leukemia (B-CLL). Koomesh 2007; 9: 1-12.

[8] Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. Trends Biochem Sci 2001; 26: 61-66.

[9] Campàs C, Cosialls AM, Barragán M, Iglesias-Serret D, Santidrián AF, Coll-Mulet L, et al. Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. Exp Hematol 2006; 34: 1663-1669.

[10] Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. Blood 1998; 91: 3379-3389.

[11] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. Genes Dev 1999; 13: 239-252.

[12] Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biol 2001; 2: 3009.1-.10.

[13] Wrzesień-Kuś A, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, Wierzbowska A, Robak T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. Apoptosis 2004; 9: 705-715.

[14] Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptopsis gene survivin. Biochemical and biophysical research Communications 2004; 314: 902-907.

[15] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nature Med 1997; 3: 917-921.

[16] Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. Blood 2000; 96: 1921-1925.

[17] Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. Lab Invest 1999; 79: 1121-6.

[18] Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine. Phytother Res 2008; 22: 999-1012.

[19] Singhal K. Anthelmintic activity of berberine hydrochloride against Syphacia obvelata in mice. Indian J Exp Biol 1976; 14: 345-347.

[20] Satou T, Akao N, Matsuhashi R, Koike K, Fujita K, Nikaido T. Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of Toxocara canis. Biol Pharm Bull 2002; 25: 1651-1654.

[21] Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. Cancer lett 2004; 203: 127-137.

[22] Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, Chen M, Wu G, et al. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. Chin Med 2011; 6: 27.

[23] Jin P, Zhang C, Li N. Berberine exhibits antitumor effects in human ovarian cancer cells. Anticancer Agents Med Chem 2015; 15: 511-516.

[24] Patil JB, Kim J, Jayaprakasha G. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. Eur J Pharmacol 2010; 645: 70-78.

[25] Kipps TJ. Interview: chronic lymphocytic leukemia: treating an incurable disease. Int J Hematol Oncol 2013; 2: 203-205.

[26] Kokhaei P, Palma M, Mellstedt H, Choudhury A. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol 2005; 16: ii113-123.

[27] Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003; 2003: 153-175.

[28] Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the international workshop on chronic lymphocytic leukemia updating the national cancer institute–working group 1996 guidelines. Blood 2008; 111: 5446-5456.

[29] Abdalla AO, Kokhaei P, Hansson L, Mellstedt H, Osterborg A. Idiotype vaccination in patients with myeloma reduced circulating myeloma cells (CMC). Ann Oncol 2008; 19: 1172-1179.

[30] Escuín D, Rosell R. The anti-apoptosis survivin gene and its role in human cancer: an overview. Clin Lung Cancer 1999; 1: 138-143.

[31] Boshra H, Wang T, Hove-Madsen L, Hansen J, Li J, Matlapudi A, et al. Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and Xenopus: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species. J Immunol 2005; 175: 2427-2437.

[32] Sugahara K, Uemura A, Harasawa H, Nagai H, Hirakata Y, Tomonaga M, et al. Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias. Int J Hematol 2004; 80: 52-58.

[33] Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 2001; 97: 2777-2783.

[34] Yip NK, Ho W. Berberine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in liver cancer cells. Oncol Reports 2013; 30: 1107-1112.



www.SID.ir

Archive of SID



[35] Pandey A, Vishnoi K, Mahata S, Tripathi SC, Misra SP, Misra V, et al. Berberine and curcumin target survivin and STAT3 in gastric cancer cells and synergize actions of standard chemotherapeutic 5-fluorouracil. Nutr Cancer 2015; 67: 1295-1306.

[36] Su YH, Tang WC, Cheng YW, Sia P, Huang CC, Lee YC, et al. Targeting of multiple oncogenic signaling pathways by Hsp90 inhibitor alone or in combination with berberine for treatment of colorectal cancer. Biochim Biophys Acta 2015; 1853: 2261-2272.



www.SID.ir

Archive of SID



# Effect of Beberine on the survivin gene expression in peripheral blood mononuclear cell of chronic lymphocytic leukemia patients in vitro

Habib Jaafarinejad (M.Sc.)[1, 2], Niloofar Ghanizadeh (M.Sc.)[1,2], Farahnaz Ghahremanfard (M.D)[3], Mehdi Barati (M.Sc.)[1], Ehsan Manouchehri Doulabi (M.Sc.)[1,2], Parviz Kokhaei (PhD)[*1, 4]

*1-Cancer Research Center and Department of Immunology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran*

*2- Student Research Committee, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran*

*3- Internal Medicine Department, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran*

*4- Immune and Gene Therapy Lab, Cancer Centre Karolinska, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden*

(Received: 18 Jun 2016; Accepted: 24 Oct 2016)

***Introduction**:* Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a type of blood malignancies that is associated with excessive proliferation of B cells. The disease is more common in men over 50 years. CLL is associated with defective apoptosis in B cells. The aim of this study was to investigate the expression of survivin protein as an inhibitor of apoptosis protein in peripheral blood mononuclear cells from CLL patients and normal subjects under the effect of berberine in vitro.

***Materials and Methods**:* In this study, 12 patients with CLL and six healthy age matched individuals as a control group were investigated. Peripheral blood was collected and, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by ficoll separation. The PBMC were cultured with Berberine drug at 25µM concentration for 48h. Finally survivin mRNA expression was investigated following cDNA synthesis by Real time PCR using SYBR Green method.

***Results**:* The expression level of survivin mRNA in CLL patients (treated with drug) compared with patients without treatment (control group) decreased significantly ($p<0.05$), but survivin mRNA level showed no significant differences in healthy donors both in treated and untreated group ($p>0.05$).

***Conclusion**:* It seems that the drug Berberine through down-regulation of survivin gene expression induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells while the drug has had no appreciable effect on normal cells. The results provide proof of principals for further investigation of Berberin in clinical setting for treatment of CLL.

***Keywords**:* Chronic lymphocytic leukemia, Real-Time Polymerase Chain Reaction, Survivin, Berberine

* Corresponding author. Tel: +98 21 22180086

azarnia.pt.82@gmail.com



www.SID.ir