Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Volume 20, Issue 4 (Autumn 2018), 603-807

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:
Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

آرسنیک تری‌اکسید با القاء اتوفاژی سبب مرگ سلول‌های لوکمی پرومیلوسیتی می‌گردد

فریده شاکری‌مقدم [۱](M.Sc)، مائده دژم فکر [۲](M.Sc)، سید حمیدالله غفاری [۳](Ph.D)، شهین احمدیان [۴](Ph.D)، علی خالقیان [۱*](Ph.D)

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

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

۳- بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۳۴۴۱۰۲۱-۲۳ khaleghian.ali@gmail.com

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

چکیده

هدف: اتوفاژی مسیر حیاتی مورد نیاز برای بقاء سلول در طول گرسنگی از طریق خودخوری و تخریب پروتئین‌ها و اندامک‌های سلولی می‌باشد. ادامه یافتن اتوفاژی منجر به مرگ سلولی می‌شود. هر چند مکانیسم القاءکننده اتوفاژی به درستی شناخته نشده است اما به نظر می‌رسد با استفاده از تنظیم صحیح آن می‌توان در جهت درمان سرطان از آن استفاده کرد. هدف این مطالعه، بررسی تاثیر آرسنیک تری‌اکسید در القاء اتوفاژی در سلولهای لوکمی پرومیلوسیتی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به بررسی نقش اتوفاژی در مرگ سلول‌های لوکمی پرومیلوسیتی NB4 که با آرسنیک تری‌اکسید تیمار شده‌اند پرداخته شد. هم‌چنین بررسی بیان ژن‌های دخیل در اتوفاژی و فرایند آپوپتوز در این سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان با استفاده از تکنیک Real Time PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که اتوفاژی باعث القاء مرگ در سلول‌های NB4 تحت تیمار با آرسنیک تری‌اکسید شده است. هم‌چنین مشخص شد که ژن‌های Bclin1 ,Atg7 و LC3 که از ژن‌های ضروری برای القاء اتوفاژی محسوب می‌شوند، هدف تهاجم آرسنیک تری‌اکسید قرار گرفته‌اند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که القاء اتوفاژی توسط آرسنیک تری‌اکسید نقش مهمی در از بین بردن سلولهای لوکمی و درمان سرطان دارد.

واژه‌های کلیدی: لوکمی حاد پرومیلوسیتی، آرسنیک تری‌اکسید، اتوفاژی، بیان ژن و آپوپتوز

مقدمه

اتوفاژی مکانیسم پروتئولیتیک حفاظت شده است که باعث تجزیه مواد سیتوپلاسمی درون ارگانل‌ها و سلول‌ها می‌شود. اتوفاژی در هموستاز سلول‌ها و بقای طولانی‌مدت آن‌ها اهمیت زیادی دارد [۱].

این فرایند تجزیه ترکیبات سلولی در لیزوزوم است که در پاتولوژی تعداد زیادی از بیماری‌ها نقش بسزایی ایفا می‌کند. دلایل مورفولوژیکی مختلف نشان داده‌اند که اتوفاژی برای اولین بار در مخمرها مورد بررسی قرار گرفته است و آنالوگ ژن‌های موثر در این فرایند هم‌اکنون در گروه‌های مختلفی از حیوانات شامل نماتودها و مگس سرکه و پستانداران یافت شده است [۲]. اتوفاژی (به زبان یونانی= خودخواری) فرایندی برای کنترل میزان و کیفیت محتویات سیتوپلاسمی در سلول‌های یوکاریوتیک است که شامل تخریب و هضم پروتئین‌های آسیب‌دیده یا بدشکل گرفته و ارگانل‌های طویل‌العمری چون میتوکندری و پراکسی زوم می‌باشد [۳]. در شرایط عادی، اتوفاژی به منظور حفظ هموستاز سلول، در مقادیر پایینی انجام می‌شود. در صورتی‌که در شرایط استرس‌زا مانند: محرومیت غذایی، کمبود فاکتورهای رشد و شرایط پاتولوژیک مانند عفونت‌ها و تجمع ماکروملکول‌های توکسیک به سرعت القا می‌شود [۴]. مواد غذایی، به ویژه مقدار اسیدهای آمینه، تنظیم‌کننده فیزیولوژیک مهمی برای ماکرواتوفاژی (اتوفاژی) محسوب می‌شوند. در زمان فقدان اسیدهای آمینه‌ها در محیط سلول اتوفاژی القاء می‌شود [۵].

در مخمرها چندین ژن شناسایی شده‌اند که در شروع فرایند اتوفاژی شرکت دارند و به اختصار Atg نامیده می‌شوند. در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مرحله نخست اتصال بین Atg_{12} و Atg_5 برقرار می‌شود [۶]. متعاقب آن فرم دوتایی Atg_{16} به کمپلکس قبلی متصل می‌شود. از طرف دیگر، زنجیره سبک ۳ پروتئین مرتبط با میکروتوبول‌ها یا LC_3، در پستانداران هومولوگ Atg_8 می‌باشد، به عنوان پروتئین پیش‌ساز در سیتوزول توسط Atg_4 از ناحیه C ترمینال شکسته شده و $LC_{3\text{-}I}$ ایجاد می‌شود. $LC_{3\text{-}I}$ توسط Atg_3 و Atg_7 فعال شده و نهایتاً با فسفاتیدیل اتانول آمین متصل می‌شود و $LC_{3\text{-}II}$ را می‌سازد. $LC_{3\text{-}II}$ پروتئین متصل شده به غشاء است که به‌ویژه همراه اتوفاگوزوم می‌باشد [۷].

اخیراً تحقیقات نشان می‌دهند که آمینواسیدها اتصال Bcl-2 به $Beclin_1$ را تنظیم می‌کنند. اولین ژن مهارکننده تومور وابسته به اتوفاژی که $Beclin_1$ است به عنوان یک شریک اتصالی برای Bcl-2 می‌باشد. $Beclin_1$ کمپلکسی را با فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز کلاس III (PI_3 کیناز) Vps_{34} تشکیل می‌دهد که سبب افزایش اتوفاژی می‌شود. اتصال Bcl-2 به $Beclin_1$ سبب مهار فعالیت PI_3 کیناز همراه $Beclin_1$ شده و اتوفاژی را مهار می‌کند [۸].

اتوفاژی همانند آپوپتوزیس یکی از اهداف درمانی در بیماری‌های مختلف از جمله انواع سرطان‌ها می‌باشد. ترکیبات دارویی مورد استفاده در شیمی‌درمانی که در درمان سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند از طریق ایجاد آپوپتوز یا اتوفاژی و یا فعال کردن مکانیسم‌های دیگر، جلوی رشد افسارگسیخته سلول‌های سرطانی را می‌گیرند [۹،۱۰].

لوکمی پرومیلوسیتی حاد (APL)، زیر گونه‌ای از لوکمی میلوئیدی حاد می‌باشد که توسط وجود جابه‌جایی کروموزومی t(15-17) مشخص می‌شود. ناهنجاری سیتوژنتیکی مذکور، سبب اتصال ژن لوکمی پرومیلوسیتی (PML) واقع بر روی کروموزوم ۱۵ به ژن گیرنده آلفا رتینوئیک اسید (RARα) واقع بر روی کروموزوه ۱۷ می‌شود [۱۱].

انکوپروتئین حاصل، باعث مهار نسخه‌برداری از ژن‌های تمایزی، آپوپتوزی و خود نوسازی سلول و در نتیجه افزایش سلول‌های نابالغ (پرومیلوسیت) در خون و مغز استخوان می‌گردد [۱۲].

شواهد زیادی مبنی بر توانایی ضد سرطانی آرسنیک تری‌اکسید (As_2O_3) بر علیه انواع مختلفی از بدخیمی‌های انسانی وجود دارد. مطالعه‌های In vitro نشان داده‌اند که As_2O_3 از راه‌های گوناگونی هم‌چون فعال‌سازی پروتئین‌های پیش آپوپتوزی، سرکوب پروتئین‌های ضد آپوپتوزی، افزایش تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS)، کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری و فعال‌سازی کسپازها، سبب بروز مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های لوکمیک می‌شود [۱۳].

امروزه As_2O_3 به عنوان تنها داروی موثر در بهبود بیماران تازه تشخیص لوکمی پرومیلوسیتیک حاد معرفی گشته است، به‌طوری‌که As_2O_3 با دوز ۰/۱۰-۰/۱۵ mg/kg، در ۹۰٪ از موارد تازه تشخیص APL، سبب دست‌یابی به تصحیح مشکلات مولکولی یا سیتوژنتیکی می‌شود. با استفاده از این غلظت، بیش‌تر عوارض گزارش شده خفیف و گذرا بوده و شامل راش‌های پوستی، دردهای اسکلتی- عضلانی، سردرد، سرگیجه، افزایش کراتینین، افزایش ترانس آمینازهای کبدی، آریتمی قلبی و در برخی موارد مرگ ناگهانی است [۱۴].

با وجود مطالعات زیادی که برای مشخص کردن چگونگی اثرگذاری As_2O_3 بر سلول‌های لوکمی انجام شده است، که غالب آن‌ها آپوپتوز و تغییرات اپی‌ژنتیکی را موثر بر گرفتن نتایج ارزشمند می‌دانند [۱۵]. بررسی اتوفاژی به عنوان دومین مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌تواند گره‌گشای این مسیر درمانی باشد تا با افزایش اطلاعات ما در مورد نحوه برخورد سلول‌های لوکمی با این ترکیبات بتوانیم عوارض جانبی که بیماران با آن‌ها روبرو هستند کم‌تر شود.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار رده سلولی NB4 با آرسنیک تری‌اکسید:

سلول NB4 مورد استفاده در این مطالعه تجربی، از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران و به شکل ویال تهیه شد. تایید رده سلولی با بررسی وجود رونوشت PML-RARα و با روش RT-PCR انجام پذیرفت. سلول‌های NB4 در محیط کشت RPMI-1640 محتوی ۱۰٪ سرم (FBS)، ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استروپتومایسین در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ گاز CO2 کشت داده شدند. در این مطالعه تجربی، رقت‌های مختلفی (۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میکرومولار) از آمپول آرسنیک تری‌اکسید (سینا دارو) در محیط کشت RPMI-1640 فاقد FBS تهیه شد.

بررسی اثر سمیت سیتوتوکسیک آرسنیک تری‌اکسید:

برای بررسی اثر سمیت و تعیین مقدار IC_{50} این دارو، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. اساس آزمایش بر مبنای توانایی سلول‌های زنده در احیای نمک تترازولیوم بروماید و تبدیل آن به رسوب فورمازان است. به همین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۳×۵ عدد از سلول‌های NB_4 که در فاز رشد لگاریتمی بودند به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد، سپس به هر چاهک، از رقت‌های µM ۰/۵-۲ داروی آرسنیک تری‌اکسید اضافه گشت. به دنبال ۴۸

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

ساعت مواجهه با دارو، تترازولیوم بروماید (سیگما) با غلظت نهایی ۰/۵ mg/mL در محیط RPMI-1640 تهیه و به هر چاهک اضافه گشت و به مدت ۴-۳ ساعت در شرایط کشت انکوبه شد و سپس در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

تست بررسی میزان فعالیت سلول:

جهت ارزیابی میزان سلول‌های زنده از رنگ تریپان‌بلو (TB) به روش Trypan Blue Dye Exclusion استفاده شد. اساس آزمایش بر مبنای توانای سلول‌های زنده در خارج‌سازی رنگ TB می‌باشد. برای انجام این آزمایش تعداد برابری از سلول‌ها (۲۰ هزار سلول در هر چاهک) در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند و شمارش و ارزیابی زنده مانی آن‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با داروی آرسنیک تری‌اکسید با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری انجام پذیرفت. درصد زنده‌مانی مربوط به هر دوز به شکل درصدی از زنده‌مانی کنترل (سلول‌های تیمارنشده) محاسبه و در نمودار ۲ به نمایش در آمده است (نمودار ۲).

بررسی اتوفاژی با میکروسکوپ الکترونی:

به منظور بررسی ایجاد فاگوزوم‌های اتوفاژی، پس از تیمار سلول‌های NB4 با آرسنیک تری‌اکسید، سلول‌ها با سانتریفیوژ رسوب داده شدند و سپس توسط محلول پارافرم آلدهید و گلوتارآلدهید ۲/۵٪ و بافر فسفات ۰/۱ مولار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس برای تثبیت سلول‌ها از تتروکسید اسمیوم محلول در بافر فسفات استفاده شد. پس از انکوبه کردن سلول‌ها با رزین و پختن رزین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، بلوک‌های به دست آمده توسط میکروتوم برش‌گیری شده و توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری Hitachi مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA:

استخراج RNA توسط کیت High Pure RNA Isolation Kit مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Roch Cat. No. 11 828 665 001) انجام شد.

بررسی محتوا و خلوص RNA

بعد از استخراج RNA از هر میکروتیوپ برای ارزیابی محتواRNA قبل از ساخته شدن cDNA از دستگاه نانودراپ استفاده شد. در این دستگاه طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر خوانده می‌شود. طول موج ۲۶۰ نانومتر برای محاسبه غلظت RNAبه کار می‌رود و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر $OD = \frac{260}{280}$ تعیین گردید.

ساخت cDNA:

مقدار µg1 از RNA برای ساخت cDNA توسط کیت cDNA Synthesis Kit (634925Takara) استفاده شد.

طراحی پرایمر:

طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner و تایید آن با نرم‌افزار تحت وب Primer-Blast انجام گرفت. تغییرات قیاسی در سطح mRNA با روش Comparative Ct محاسبه گشت که برای این منظور از ژن هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HPRT) برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها و نمونه تیمار نشده به عنوان نمونه مرجع استفاده شد.

جدول ۱ . توالی پرایمر های استفاده شده در Real Time PCR

ژن	Sense	Antisense
LC3	CCGAACCTTCGAACAGAGAG	AGGCTTGGTTAGCATTGAGC
Beclin1	AGCTGCCGTTATACTGTTCTG	ACTGCCTCCTGTGTCTTCAATCTT
Atg 7	AGATTGCCTGGTGGGTGGT	GGGTGATGCTGGAGGAGTTG

بررسی بیان ژن‌ها توسط RT-PCR:

برای بررسی کمی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR، از دستگاه Step One Plus و کیت SYBER Green Precision TM 2X qPCR Mastermix استفاده شد. واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل µL ۱۷ میکس، µL ۱ آغازگر (غلظت ۱ پیکومول) وµL ۲ از cDNA مربوطه انجام گرفت. چرخه دمایی شامل یک مرحله ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال‌سازی آنزیم و متعاقب آن ۴۵ چرخه دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (واسرشتگی)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (اتصال آغازگر به هدف)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (تکثیر) انجام شد.

پس از آن منحنی دمای ذوب (Melting Curve) انجام شد تا از تکثیر اختصاصی رشته DNA هدف، اطمینان حاصل شود.

تجزیه و تحلیل آماری:

در این مطالعه، تمامی آزمایش‌ها به شکل سه آزمون مستقل انجام گرفته و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) نمایش داده شده است. برای محاسبات آماری و رسم منحنی، از نرم‌افزار SPSS 13 و روش Student s t-test و one-way ANOVA استفاده شد. مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

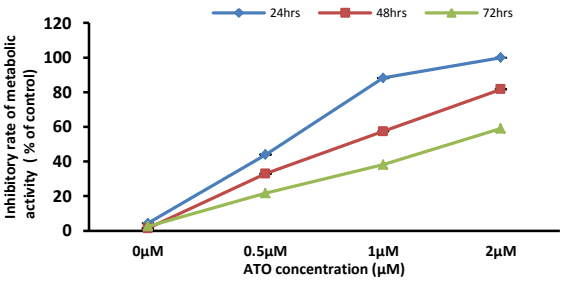
نتایج

تعیین سمیت سلولی آرسنیک تری‌اکسید بر روی سلول‌های NB4. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف آرسنیک تری‌اکسید، میزان اثر به روش MTT بررسی شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism، مقدار غلظت مهاری ۵۰٪ (IC50) بعد از ۴۸ ساعت تیمار µM ۱ به دست آمد. با

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

توجه به نتایج به دست آمده غلظت ۱ µM آرسنیک تری‌اکسید برای ادامه کار انتخاب گردید.

نتایج به دست آمده از آزمون MTT نشان می‌دهد که داروی آرسنیک تری‌اکسید منجر به کاهش وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیکی سلول‌های NB4 می‌شود. تیمار سلول‌ها با بیش‌ترین دوز دارو (۲µmol) میزان فعالیت متابولیکی را پس از گذشت ۷۲ ساعت تا ۹۳٪ کاهش می‌دهد (شکل ۱). هم‌چنین مشخص شد که با افزایش دوز از ۰/۵ تا ۲ میکرومولار، اثر مهاری نیز افزایش می‌یابد به‌طوری‌که در زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار بهترین شرایط برای تعریف IC50 به‌دست می‌آید که طی آن در دوز ۱ µmol در حدود ۵۳٪ سلول‌ها فعالیت متابولیکی خود را از دست داده‌اند.

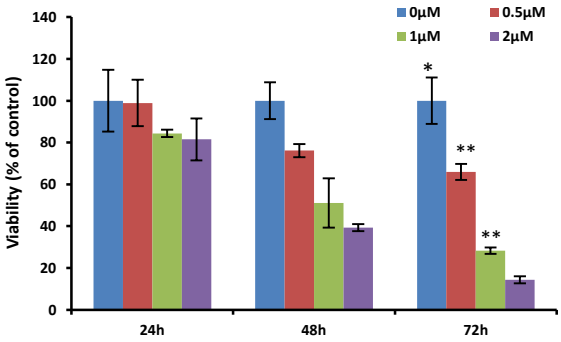


شکل ۱. تیمار با آرسنیک تری اکسید سبب مهار فعالیت متابولیکی می‌شود. با افزایش دوز آرسنیک تری اکسید میزان مهار فعالیت متابولیکی به صورت وابسته به زمان کاهش چشم‌گیری پیدا می‌کند.

بررسی کاهش میزان حیات سلول‌ها بعد از تیمار با آرسنیک تری‌اکسید. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار سلول‌ها با دوز انتخاب شده، ۲۰ میکرولیتر از سلول‌ها با رنگ تریپان‌بلو مجاور شدند و پس از شمارش سلول‌ها، درصد زنده‌مانی آن‌ها محاسبه شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت نتایج نشان‌دهنده کاهش چشمگیر زنده‌مانی سلول‌ها به دنبال تیمار با آرسنیک تری‌اکسید بودند.

میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر P<۰/۰۵، **، بیانگر P<۰/۰۱) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های زنده گروه‌های تیمارشده با آرسنیک تری‌اکسید در مقایسه با گروه کنترل، به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافته است (شکل ۲). با وجود این‌که دوزهای ۰/۵ و ۱ میکرومولار از آرسنیک تری‌اکسید قادر به اعمال اثر آنتی پرولیفراتیو بر رده سلولی NB4 طی ۲۴ ساعت نمی‌باشد، تیمار سلول‌ها برای زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث جلوگیری از تکثیر سلول‌ها می‌شود. هم‌چنین روند کاهش تعداد سلول‌های زنده با افزایش دوز، افزایش می‌یابد به‌طوری‌که این دارو در دوز ۱ میکرومولار و در زمان ۷۲ ساعت بیش از ۷۵٪ سلول‌ها را می‌کشد.

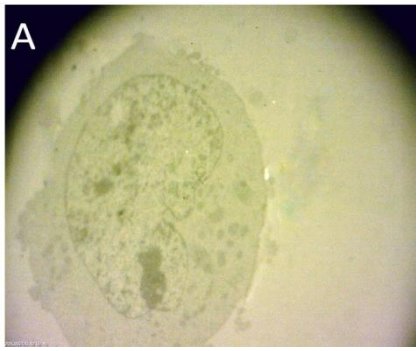


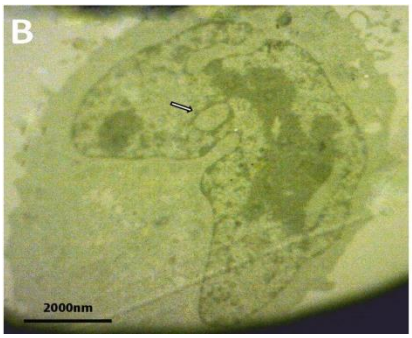
شکل ۲. میزان زنده مانی سلول‌های NB4 تحت تیمار با دوز های مختلف آرسنیک تری اکسید در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. در مقایسه با کنترل، میزان زنده مانی به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان کاهش چشم‌گیری داشته است.

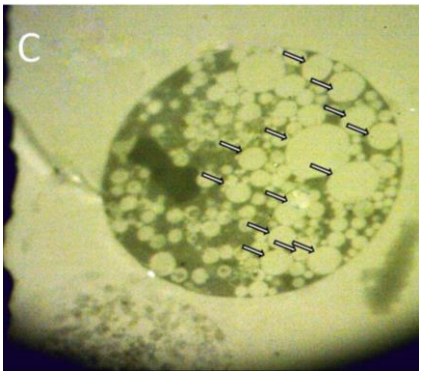
بررسی ظهور واکئول‌های اتوفاژی با میکروسکوپ الکترونی. به منظور بررسی ایجاد فاگوزوم‌های اتوفاژی، پس از تیمار سلول‌های NB4 با آرسنیک تری‌اکسید، سلول‌ها با سانتریفیوژ رسوب داده شدند و سپس توسط محلول پارافرم آلدهید و گلوتارآلدهید ۲/۵٪ و بافر فسفات ۰/۱ مولار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس برای تثبیت سلول‌ها از تتروکسید اسمیوم محلول در بافر فسفات استفاده شد. پس از انکوبه کردن سلول‌ها با رزین و پختن رزین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، بلوک‌های به دست آمده توسط میکروتوم برش‌گیری شده و توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری گذاره (Hitachi H 600) با ولتاژ ۵۰۰۰۰ × ۷۵ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفتند.

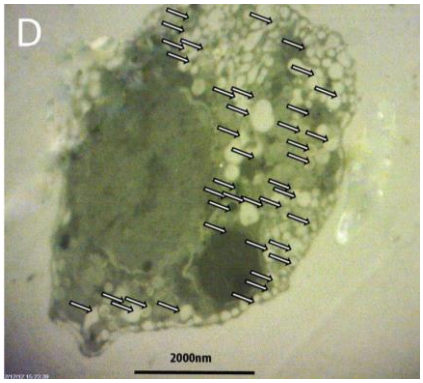
نتایج به دست آمده از مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که به صورت وابسته به دوز طی زمان ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌های NB4 با آرسنیک تری‌اکسید، ظهور واکئول‌های اتوفاژی که نتیجه فعال شدن لیزوزوم‌های سلولی و شروع خودخواری است، افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که در میکروگراف B که مربوط به تیمار با کم‌ترین دوز آرسنیک تری‌اکسید (۰/۵ میکرومولار) می‌باشد، فقط یک عدد از این واکئول‌های هضمی وجود دارد و در دوز ۱ میکرومولار تعداد این واکئول‌ها به بیش از ۱۰ عدد رسیده و در دوز ۲ میکرومولار تعداد بی‌شماری از این واکئول‌های اتفاژیک ظاهر می‌شوند و سلول را به سمت مرگ پیش می‌برند (شکل ۳).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]





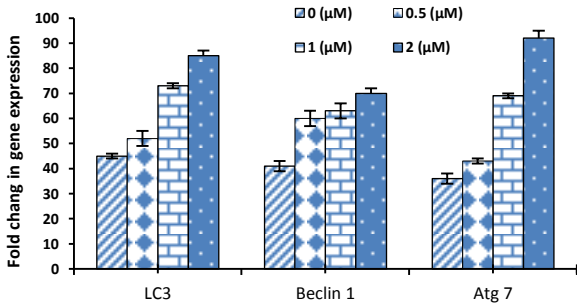




شکل ۳. اتوفاژی در سلول‌های NB4 تیمار شده با آرسنیک تری اکسید رخ می‌دهد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که آرسنیک تری‌اکسید باعث ظهور واکئول‌های اتوفاژی در این سلول‌ها شده و با افزایش دوز بر میزان این واکئول‌های تخریبی افزوده می‌گردد (واکئول‌های اتوفاژی با فلش مشخص شده است). A- سلول کنترل تیمار نشده، B- تیمار با غلظت ۰،۵ میکرومولار، C- تیمار با غلظت ۱ میکرومولار، D- تیمار با غلظت ۲ میکرومولار،

سنجش بیان ژن‌ها توسط RQ-PCR. برای بررسی کمی بیان ژن‌ها به روش RQ-PCR، از دستگاه Step One Plus و کیت SYBER Green Precision TM 2X qPCR Mastermix استفاده شد. واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۷ µL میکس، ۱ µL آغازگر (غلظت ۱پیکومول) و ۲ µL از cDNA مربوطه انجام گرفت. چرخه دمایی شامل یک مرحله ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال‌سازی آنزیم و متعاقب آن ۴۵ چرخه دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (واسرشتگی)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (اتصال آغازگر به هدف)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (تکثیر) انجام شد.

تصاویر نشان می‌دهد که به صورت وابسته به دوز بیان ژن‌های Beclin 1, Atg 7 و LC3 تحت تیمار آرسنیک تری‌اکسید نسبت به کنترل افزایش می‌یابد (شکل ۴). افزایش بیان ژن‌های Atg 7 و LC3 نشان از شرایط مهیا شده برای ایجاد اتوفاگوزوم‌ها را می‌دهد و افزایش بیان ژن Beclin 1 و ارتباط تنگاتنگ این ژن با عناصر آپوپتوزیس نشان‌دهنده همراهی و همکاری دو فرایند اتوفاژی و آپوپتوزیس با یک‌دیگر می‌باشد.



شکل ۴. تاثیر تیمار آرسنیک تری اکسید بر بیان ژن های Beclin 1, Atg 7 و LC3 در رده سلولی NB4. سلول‌ها با دوز۱ میکرومولار آرسنیک تری اکسید برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد نظر تحت آزمون Real-time PCR قرار گرفتند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

اتوفاژی به عنوان فرایند کاتابولیک تطابق‌یافته در پاسخ به استرس‌های متابولیک مانند محرومیت غذایی، فقدان فاکتورهای رشد و هایپوکسی فعال می‌شود. این فرایند تخریبی عظیم سبب تولید آمینواسیدهای آزاد و اسیدهای چرب و نهایتاً تولید انرژی می‌شود [۱۶]. نقش اتوفاژی به عنوان مکانیزم بقاء در طول دوره کوتاه‌مدت کمبود آمینواسیدها به خوبی نشان داده شده است [۱۷].

اتوفاژی ممکن است نمایانگر یک نوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به نام مرگ سلولی اتوفاژیک و یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع ۲ نیز باشد. مرگ سلول اتوفاژیک،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

توسط تجمع وزیکول‌های اتوفاژیک مشخص می‌شود و از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع ۱ یا آپوپتوز متمایز است. مطرح شده است که اتوفاژی کنترل نشده می‌تواند منجر به مرگ سلولی شود، که احتمالاً به خاطر تخریب بیش از حد ترکیبات سلولی است [۱۸].

امروزه علی‌رقم پیشرفت‌های انجام‌گرفته در زمینه معرفی داروهای جدید، درمان با استفاده از داروهای ضد سرطان شامل داروهای سیتوتوکسیک مثل آرسنیک تری‌اکسید هم‌چنان امیدبخش است. در این مطالعه به بررسی چگونگی اعمال اتوفاژی در سلول‌های NB4 تیمار شده با آرسنیک تری‌اکسید پرداخته شد. شواهد محکمی وجود دارد مبنی بر این‌که آرسنیک تری‌اکسید مسیرهای پیام‌رسانی متعددی را متاثر ساخته و منجر به تغییرات گسترده در عمل‌کرد سلول می‌شود به گونه‌ای که آثاری همچون بروز آپوپتوز، توقف رشد و مهار آنزیوژنز را بر جای می‌گذارد [۱۹].

مطالعات متعددی نشان که اتوفاژی از طریق تخریب اتکوپروتئین PML-RAR اثرات درمانی خود را القا می‌کند. به عنوان مثال ساکسون و همکارانش نشان دادند که ATRA (ویتامین A) و آرسنیک تری‌اکسید باعث القا اتوفاژی از طریق مسیر راپامایسین در سلول‌های APL می‌شوند [۲۰]. آرسنیک تری‌اکسید از طریق سیستم اوبی کویتین- پروتئازوم (UPS) باعث تجزیه PML-RAR می‌شوند. این مسیر از طریق استفاده از مهارکننده‌های پروتئازوم که جلوی تجزیه PML-RAR را توسط ATRA و آرسنیک تری‌اکسید سد می‌کند مشخص شده است [۲۲،۲۱].

Breitenbach و همکارانش مشخص کردند که در حضور آرسنیک تری‌اکسید اجزاء هسته‌ای PML به وجود می‌آید که از ترکیب UPS و RNF4 و تعدیل‌کننده کوچک شبه اوبی کویتین (SUMO) تشکیل شده است [۲۳]. هر چند نقش UPS در درمان از طریق تجزیه PML-RAR به خوبی مشخص شده است اما نقش اتوفاژی در تخریب این انکوپروتئین هنوز مشخص نشده است [۲۰].

اتوفاژی مکانیسم مرگ سلولی متفاوت از آپوپتوز است که آن را به عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده نوع II می‌شناسند و شامل اتوفاگوزوم لیزوزومی است که تجزیه اجزا سلولی را انجام می‌دهد [۲۴]. شواهد زیادی نشان می‌دهد که اتوفاژی نقش بسزایی در کنترل حیات سلول‌های بدخیمی ایفا می‌کند [۲۴]. این حقیقت اولین بار توسط بررسی فعالیت یک تومورساپرسور به‌نام Beclin I که پس از اجزا مداخله‌گر در شروع اتوفاژی است مورد بررسی قرار گرفت [۲۵].

مطالعات اولیه نشان داد که کاهش بیان پروتئین‌های اتوفاژی ممکن است باعث پیشرفت سرطان سینه و یا سایر تومورها شود [۲۶]. هر چند ارتباط بین اتوفاژی و آپوپتوز در کنترل سرطان‌زایی و حیات سلول‌های توموری هنوز مشخص نشده است اما مستندات نشان می‌دهد که اتوفاژی در تخریب PML-RAR مداخله می‌کند [۲۸،۲۷]. Goussetis و همکارانش نشان دادند که آرسنیک تری‌اکسید از طریق مسیر MEK/ERK اتوفاژی را در سلول‌های لوکمی القا می‌کند. آن‌ها با استفاده از مهارکننده پروتئین‌های حیاتی اتوفاژی مثل beclin I و Atg نشان دادند که آرسنیک تری‌اکسید اثر درمانی خود را از دست می‌دهد [۲۹].

ژن مداخله‌گر در اتوفاژی Beclin I در ۷۵-۴۰٪ از سرطان سینه، تخمدان و پروستات به صورت تک آللی دچار حذف شده است [۳۰]. آرسنیک تری‌اکسید باعث القا اتوفاژی در لوکمی لنفوسیتیک T انسانی می‌شود [۱۸]. Ren و همکارانش در سلول‌های NB4 تیمارشده با آرسنیک تری‌اکسید با استفاده از ۳-متیل آدنین (۳-MA) جلوی اتوفاژی را سد کردند و با استفاده از راپامایسین (RAPA) باعث القا اتوفاژی شدند [۳۱].

اتوفاژی بر اساس عامل القاکننده و بر اساس شرایط سلول به عنوان یک مکانیسم محافظتی در سلول‌های بدخیمی عمل می‌کند و یا با نشان دادن اثر مخالف باعث افزایش تولید پاسخ‌های آنتی‌نئوپلازی می‌شود [۳۲-۳۴]. آرسنیک تری‌اکسید مهم‌ترین ترکیب در مطالعات Invitro و Invivo در درمان لوکمی از طریق القاء آپ.پتوز می‌باشد [۳۶،۳۵]. هر چند اطلاعات زیادی درباره نحوه القاء آپوپتوز توسط آرسنیک تری‌اکسید طی سال‌های اخیر به دست آمده است اما اطلاعات چندانی درباره القاء آتوفاژی و چگونگی تنظیم آن توسط این ترکیب وجود ندارد.

در این مطالعه ما به بررسی توانایی آرسنیک تری‌اکسید در القاء اتوفاژی در سلول‌های لوکمی پرومیلوسیتی پرداختیم و سپس بیان بعضی ژن‌های دخیل در این فرایند را مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج ما اثبات کرد که آرسنیک تری‌اکسید القاکننده قوی اتوفاژی در سلول‌های لوکمی پرومیلوسیتی می‌باشد و این راه کار از طریق افزایش بیان ژن‌های Beclin 1, Atg 7 و LC3 انجام می‌دهد.

در این مطالعه به بررسی مورفولوژی سلول‌های NB4 تحت تیمار با آرسنیک تری‌اکسید پرداختیم. نتایج نشان داد که ویزیکول‌های اتوفاژی در این سلول‌ها ظاهر می‌شوند و با افزایش دوز دارو میزان این واکئول‌های هضمی بیش‌تر می‌گردد (شکل ۲).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

همچنین ما نشان دادیم که همزمان با القا آپوپتوز، القا اتوفاژی نیز در اثر تیمار سلول‌های لوکمی پرومیلوسیتی رخ می‌دهد. نیاز است در مطالعات بعدی به بررسی اثر آرسنیک تری‌اکسید در القاء اتوفاژی در سایر سلول‌های لوکمی حاد میلوسیتی (AML) و سایر گونه‌های لوکمی بپردازیم.

آرسنیک تری‌اکسید می‌تواند با القاء اتوفاژی اثر درمانی خود را اعمال کند [۳۸،۳۷] و تلاش‌ها باید به‌کار گرفته شود تا با طراحی مولکول‌های کوچک مشابه که بتوانند به صورت همزمان با آرسنیک تری‌اکسید به‌کار گرفته شود تا بر مقاومت به دارو سلول‌های لوکمی غلبه کنند.

در مطالعه انجام شده به بررسی تغییرات سطح بیانی سه ژن دخیل در مسیر اتوفاژی و بررسی تغییرات مورفولوژی ناشی از تشکیل واکئول‌های اتوفاژی پرداخته شد اما نیاز است برای فهم بهتر این فرایند با استفاده از مطالعات سیتوشیمی و بررسی تغییرات سطح بیان پروئین‌های دخیل در اتوفاژی به طور دقیق‌تر چگونگی شروع و مکانیسم اعمال این تغییرات مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان به شماره طرح های ۷۵۹و ۷۷۹ انجام شده است.

منابع

[1] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature 2008; 451: 1069-1075.

[2] Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 931-937.

[3] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10: 458-467.

[4] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 2008; 132: 27-42.

[5] Mizushima N. Autophagy: process and function. Genes Dev 2007; 21: 2861-2873.

[6] Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. Annu Rev Nutr 2007; 27: 19-40.

[7] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem 2007; 282: 24131-24145.

[8] Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell 2005; 122: 927-939.

[9] A-niapour N, shokri gara geshlagi S, amani M, sharifi pasandi M, salehi H, niapour A. Effects of all trans retinoic acid on apoptosis induction and notch1, hes1 genes expression in gastric cancer cell line MKN-45. Koomesh 2016; 17: 1024-1032. (Persian).

[10] B- Jaafarinejad H, Ghanizadeh N, Ghahremanfard F, Barati M, Manouchehri Doulabi E, Kokhaei P. Effect of Beberine on the survivin gene expression in peripheral blood mononuclear cell of chronic lymphocytic leukemia patients in vitro. Koomesh 2017; 19: 227-232. (Persian).

[11] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood 2008; 111: 2505-2515.

[12] Sell S. Leukemia: stem cells, maturation arrest, and differentiation therapy. Stem Cell Rev 2005; 1: 197-205.

[13] Canestraro M, Galimberti S, Savli H, Palumbo GA, Tibullo D, Nagy B, et al. Synergistic antiproliferative effect of arsenic trioxide combined with bortezomib in HL60 cell line and primary blasts from patients affected by myeloproliferative disorders. Cancer Genet Cytogenet 2010; 199: 110-120.

[14] Westervelt P, Brown RA, Adkins DR, Khoury H, Curtin P, Hurd D, et al. Sudden death among patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. Blood 2001; 98: 266-271.

[15] Khaleghian A, Ghaffari SH, Ahmadian S, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Metabolism of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells. J Cell Biochem 2014; 115: 1729-1739.

[16] Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. Cell 2007; 128: 931-946.

[17] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling. Cell Res 2014; 24: 42-57.

[18] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 741-752.

[19] Miller WH, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res 2002; 62: 3893-3903.

[20] Isakson P, Bjørås M, Bøe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. Blood 2010; 116: 2324-2331.

[21] Jun Z, Valerie L, Hugues T. Pathways of retinoicacid—or arsenic trioxide. induced PML/RARa catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. Oncogene 2001; 20: 7257-7265.

[22] Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, et al. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor α (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. Cancer Res 1996; 56: 2945-2948.

[23] Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, et al. Arsenic degrades PML or PML–RARα through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. Nat Cell Biol 2008; 10: 547-555.

[24] Hu J, Liu YF, Wu CF, Xu F, Shen ZX, Zhu YM, et al. Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 3342-3347.

[25] Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. Science 2001; 292: 1552-1555.

[26] Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 1999; 402: 672-676.

[27] Kamitsuji Y, Kuroda J, Kimura S, Toyokuni S, Watanabe K, Ashihara E, et al. The Bcr-Abl kinase inhibitor INNO-406 induces autophagy and different modes of cell death execution in Bcr-Abl-positive leukemias. Cell Death Differ 2008; 15: 1712-1722.

[28] Ertmer A, Huber V, Gilch S, Yoshimori T, Erfle V, Duyster J, et al. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. Leukemia 2007; 21: 936-942.

[29] Goussetis DJ, Altman JK, Glaser H, McNeer JL, Tallman MS, Platanias LC. Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide. J Biol Chem 2010; 285: 29989-29997.

[30] Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. J Biol Chem 2007; 282: 18573-18583.

[31] Ren Y, Xie Y, Chai L, Wang S, Cheng M. Autophagy modification augmented the treatment effects initiated by arsenic trioxide in NB4 cells. Med Oncol 2011; 28: 231-236.

[32] Apel A, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. Autophagy—A double- edged sword in oncology. Int J Cancer 2009; 125: 991-995.

[33] Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases: a new cell death program. Cell Cycle 2004; 3: 1122-1124.

[34] Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. Apoptosis 2009; 14: 376-391.

[35] Platanias LC. Biological responses to arsenic compounds. J Biol Chem 2009; 284: 18583-18587.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[36] Finn PF, Mesires NT, Vine M, Dice JF. Effects of small molecules on chaperone-mediated autophagy. Autophagy 2005; 1: 141-145.

[37] Khaleghian A, Ghaffari SH, Ahmadian S, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Metabolism of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells. J Cell Biochem 2014; 115: 1729-1739.

[38] Hassani S, Khaleghian A, Ahmadian S, Alizadeh S, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Ghaffari SH. Redistribution of cell cycle by arsenic trioxide is associated with demethylation and expression changes of cell cycle related genes in acute promyelocytic leukemia cell line (NB4). Ann Hematol 2018; 97: 83-93.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Arsenic trioxide induction autophagy in human acute promyelocytic leukemia

Faride shakerimoghadam (M.Sc)[1], Maedeh Dejamfekr (M.Sc)[2], Seyed Hamidollah Ghaffari (Ph.D)[3], Shahin Ahmadian (Ph.D)[4], Ali Khaleghian (Ph.D)[*1]

1- Dept. of Biochemistry, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2- Student Research Committee, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
3- Hematology Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Dept. of Biochemistry and Biophysics, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 2333441021 khaleghian.ali@gmail.com
Received: 11 Nov 2017; Accepted: 19 May 2018

Introduction*:* Autophagy is a survival pathway required for cellular viability during starvation through catabolic self digestion of damaged proteins and organelles; however, autophagy may result in cell death if it proceeds to completion. Although the exact mechanism of this process is not clear, it seems that proper regulation of autophagy can potentially contribute to the therapeutics of cancers. The aim of this study was to determine the role of Arsenic trioxide (As2O3) in the induction of autophagy in human acute promyelocytic leukemia.

Materials and Methods*:* In this study, the role of autophagy in the As2O3-induced death of NB4 cells was assessed using electron microscopy. Also, quantitative real-time PCR method was used for expression of autophagy related genes in dose and Time dependent manner.

Results: Our results showed that autophagy induces death in NB4 cells treated with arsenic trioxide. It was also found that the Atg7, Bclin1 and LC3 genes, which are essential genes for induction of autophagy, are the target of arsenic trioxide invasion.

Conclusion: This study showed As2O3-induced autophagy plays an important role in eliminating leukemia cells and treatment of cancer.

Keywords*:* Acute Leukemia, Promyelocytic, Autophagy, Gene Expression, Arsenic Trioxide.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]