



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 2 (Spring 2019), 205- 393**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

## بررسی تاثیر آپوتوتیک انتقال ژن آپوپتین به رده سلولی مالتیپل میلوما

علی انجام نجم‌الدینی<sup>۱</sup> (M.Sc)، روح‌الله وهاب‌پور<sup>۲</sup> (Ph.D)، عطیه پورباقری سیگارودی<sup>۳</sup> (M.Sc)، سوفیا سروریان<sup>۴</sup> (M.Sc)، داود بشاش<sup>۱\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه میسور، هند

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

d.bashash@sbmu.ac.ir

• نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴

### چکیده

هدف: از زمان شناسایی مالتیپل میلوما، دومین بدخیمی شایع هماتولوژیک، پیشرفت‌های شگرفی در جهت افزایش میزان طول عمر بیماران صورت گرفته است. در دوره‌ای که استفاده راه‌کارهای درمانی جدید رو به افزایش است، کلون کردن ژن‌های القاء‌کننده آپوپتوز در ژنوم سلول‌های بدخیم به طور چشمگیری مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، اثر ضد سرطانی و کتور بیان‌کننده ژن آپوپتین را در رده سلولی مشتق شده از مالتیپل میلوما (KMM-1) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، به منظور انتقال ژن آپوپتین به رده سلولی KMM-1، وکتور لنتی ویروسی بیان‌کننده آپوپتوتین ساخته شد. سپس از با استفاده از تکنیک فلوسیتومتری و quantitative real-time PCR به ترتیب کارایی ترانس داکشن و بیان ژن آپوپتین مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه، اثر ضدسرطانی بیان ژن آپوپتین در رده سلولی KMM-1 به روش MTT و تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج فلوسیتومتری نشان داد که وکتور بیان‌کننده آپوپتین به صورت موفقیت‌آمیز و با کارایی ترانس داکشن بیش از ۹۰٪ به درون سلول‌های KMM-1 انتقال یافته است. همچنین دریافتیم که بیان بیش از حد آپوپتوتین، که با افزایش میزان mRNA به حدود ۸ برابر مشخص شد، می‌تواند سبب القا اثر سایتوتوکسیک در سلول‌های مالتیپل میلوما گردد. نتایج نشان داد که بیان آپوپتوتین نه تنها زنده‌مانی سلول‌ها را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد ( $P < 0/001$ )، بلکه به طور مشخص فعالیت متابولیک را نیز مهار کرد ( $P < 0/001$ ).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که وکتور بیان‌کننده ژن آپوپتین دارای اثر ضد سرطانی در مالتیپل میلوما بوده و می‌تواند در آینده نزدیک از نظر بالینی قابل دسترس باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتین، مالتیپل میلوما، رده‌ی سلولی KMM-1

### مقدمه

مالتیپل میلوما یک بدخیمی ناشی از تکثیر نئوپلاستیک سلول‌های بدخیم پلاسماسل در مغز استخوان می‌باشد. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ در ایالات متحده آمریکا صورت پذیرفته است نشان می‌دهد که سالانه حدود ۲۶۸۵۰ نفر در مجموع هر دو جنس مرد و زن (با شیوع بیش‌تر در مردان نسبت به زنان) در این کشور به این بدخیمی مبتلا می‌شوند که از این حیث جایگاه دوم را در بین انواع بدخیمی‌های خونی از آن خود کرده است [۱]. با وجود پیشرفت‌های شگرفی که در روند درمان این افراد صورت پذیرفته است، مالتیپل میلوما همچنان به عنوان یک بیماری غیر قابل درمان محسوب می‌شود؛ به نحوی که حدود نیمی

از افراد مبتلا به مالتیپل میلوما فوت کرده و تنها درصد اندکی از افراد مبتلا (به دلیل جوان بودن و استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی) جان سالم بدر می‌برند. یکی از درمان‌های موثر در این بدخیمی، پیوند مغز استخوان است که دو روش آلوگرافت و اتولوگ برای آن موجود است؛ روش اتولوگ به دلیل نداشتن عوارضی همچون GVHD و همچنین دسترسی ساده‌تر به آن می‌تواند جایگزینی برای روش آلوگرافت باشد. مشکل موجود در این درمان، امکان آلودگی سلول‌های بنیادی با سلول‌های توموری است که موجب عود بیماری خواهد شد. برای کاهش میزان آلودگی روش‌های زیادی وجود دارد یکی از موثرترین

۱۰۰µ استرپتو مایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند.

ساخت و تیتراسیون وکتور لنتی‌ویروسی بیان‌کننده ژن آپوپتین. به منظور ساخت وکتور لنتی‌ویروسی از سه پلاسمید pCDH (پلاسمید انتقال‌دهنده ژن)، pMD2G (پلاسمیدی برای ساخت پوشش وکتور لنتی‌ویروس) و psPAX2 (حاوی ژن‌های سازنده کپسید وکتور لنتی‌ویروسی) به ترتیب به نسبت ۱:۱:۳ استفاده شد. وکتور لنتی‌ویروسی دارای ژن آپوپتین (LV-GFP-Apoptin) از پلاسمید pCDNA3.1-GFP-Apoptin توسط روش Cloning PCR تهیه گردید؛ بدین منظور، پرایمری برای آپوپتین داخل پلاسمید pCDNA طراحی شد که حاوی دو جایگاه برش برای آنزیم‌های ECORI و BamHI در دو سمت خود بود. پس از انجام PCR، باند الکتروفورز مربوط به ژن آپوپتین از ژل استخراج شده و سپس به داخل پلاسمید pCDH منتقل شد. در ادامه، هر سه پلاسمید pCDH، psAX2 و PMD2G توسط PolyFect-Transfection-Reagent (QIAGEN آمریکا) به داخل رده سلولی HEK293T منتقل گشته و ویروس در ساعت‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برداشت شد. برای تغلیظ ویروس نیاز به التراسانتریفیوژ به مدت ۳ ساعت است. به منظور تیتراسیون ویروس تغلیظ‌شده، میزان پروتئین p24 توسط کیت الایزای کمی (Abcam) اندازه‌گیری شد. محاسبه تعداد ویروس نیز با در نظر گرفتن هر ۲۰۰۰ ملکول p24 برای هر ویروس صورت پذیرفت [۱۲]؛ این روش برای هر دو وکتور لنتی‌ویروسی دارای ژن آپوپتین و فاقد ژن آپوپتین انجام شد. شایان ذکر است که برای تمامی تست‌ها از MOI معادل ۵ استفاده شد.

بررسی شمارش سلولی به روش تریپان بلو. برای بررسی قدرت تکثیر سلول‌ها از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو استفاده شد. اساس این آزمایش بدین ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر می‌باشند، حال آن‌که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند. تعداد سلول‌های زنده و مرده بعد از مجاورت سلول‌ها با LV-GFP-Apoptin در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ با استفاده از لام هموسایتومتر (لام نتوبار) شمارش شده و درصد زنده‌مانی محاسبه شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی به روش MTT

به منظور ارزیابی اثر سایتوتوکسیک بیان ژن آپوپتین در سلول‌ها و تعیین مقادیر IC<sub>50</sub> از روش MTT استفاده شد. به همین منظور، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد LV-GFP-Apoptin اضافه گشته و به مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، به سلول‌های داخل پلیت محلول MTT (۵ mg/ml) اضافه گردید و مجدداً به مدت ۳ ساعت

روش‌ها استفاده از ژن‌درمانی با استفاده از وکتورهای ویروسی است [۳،۲].

ژن‌درمانی روش نوینی است که امروزه به دلیل نقشی که در درمان بیماری‌های متابولیک، ژنتیکی و انواع سرطان‌ها دارد، بسیار مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. هدف اصلی این روش، انتقال یک ژن خاص به سلول هدف و به تبع آن بیان ژن مذکور در سلول با هدف ایجاد اثرات درمانی است [۴]. با این حال مشکل مهمی که در این روش وجود دارد، نقص در سیستم انتقال ژن با وکتورهای ویروسی و دریافت کم توسط سلول‌های هدف می‌باشد. وکتورهای موجود مشکلات زیادی از جمله بازده پایین ترانس-داکشن، بیان کوتاه‌مدت ژن‌های درمانی و القاء پاسخ ایمنی از سوی میزبان دارند. شایان ذکر است که امروزه نسل جدید وکتورهای بر پایه لنتی‌ویروس‌ها مورد آزمایش و بررسی قرار گرفته‌اند؛ لنتی‌ویروس‌ها یک زیرگروه از رتروویروس‌ها هستند که هم سلول‌های دارای قابلیت تکثیر و هم سلول‌های فاقد توانایی تکثیر را آلوده می‌کنند. در مطالعاتی که صورت گرفته است کارایی بسیار بالا و بیان طولانی مدت ژن منتقل‌شده (تا ۶ ماه) در بسیاری از سلول‌ها به اثبات رسیده است [۵]. وکتورهای رتروویروسی قابلیت وارد شدن برگشت‌ناپذیر به DNA سلول میزبان را دارند و وکتورهای مناسبی برای ایجاد تغییرات دائم ژنتیکی در سلول‌ها هستند [۴].

آپوپتین، پروتئینی است که توسط ویروسی مربوط به پرندگان کد می‌شود و در بسیاری از رده‌های سلول سرطانی مرتبط با انسان می‌تواند به صورت اختصاصی باعث القاء آپوپتوز شود. مطالعات نشان داده است که آپوپتین در سلول‌های نرمال به دلیل تجمع در سیتوپلاسم قادر به فعال کردن مرگ سلولی نمی‌باشد، در حالی که در سلول‌های سرطانی آپوپتین در هسته جای می‌گیرد [۶-۸]. علاوه بر این، میزان فسفریلاسیون آپوپتین در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال بیشتر است [۷، ۹، ۱۰]. آپوپتین به دلیل توانایی القاء اختصاصی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، پتانسیل انکارناپذیری در ژن‌تراپی دارد [۹-۱۱]. از این رو در این مطالعه با انتقال آپوپتین به وسیله وکتور لنتی‌ویروسی بر آن شدیم تا تاثیر بیان این ژن در سلول‌های KMM-1 (مشتمل از مالتیپل میلوما) را مورد بررسی قرار دهیم.

#### مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی. مطالعه انجام شده از نوع تجربی می‌باشد. سلول‌های KMM-1 (شرکت JCRB Cell Bank ژاپن) که مشتق از مالتیپل میلوما می‌باشد، در محیط کشت RPMI-1640 و سلول‌های HEK293T (انستیتو پاستور ایران) در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ U/ml

بررسی فلوسایتومتریکی میزان کارایی ترانس داکشن. برای بررسی کارایی ترانس داکشن از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. بدین منظور، ۴۸ ساعت پس از پرورش و ورود وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن آپوپتین به داخل سلول‌های KMM-1 می‌توان میزان ترانس داکشن را به واسطه ایجاد نور فلورسنت پروتئین GFP بیان شده در سلول‌های آلوده و به وسیله میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر بنفش به صورت کیفی مورد بررسی قرار داد؛ بدین صورت که سلول‌های آلوده شده به وکتور لنتی ویروسی بیان‌کننده ژن آپوپتین از خود نور سبز ساطع می‌کنند که با میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده می‌باشد. برای بررسی کمی میزان ورود وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن آپوپتین و GFP می‌توان از فلوسایتومتری استفاده کرد؛ بدین صورت که ۲۰ هزار سلول آلوده به وکتور لنتی ویروسی به دستگاه فلوسایتومتری داده شده و درصد سلول‌های بیان‌کننده فلورسنت سبز (+GFP) در کانال FL1 (فیلتر سبز) مورد ارزیابی قرار گرفت. شایان ذکر است که این درصد نشان‌دهنده راندمان ترانسداکشن سلول‌های KMM-1 توسط وکتور لنتی ویروسی می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری. تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام شده و مقادیر گزارش شده به شکل  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  قید شدند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش  $t$  test و نرم‌افزار SPSS17 و GraphPad Prism7 استفاده شد. مقادیر  $P \leq 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

## نتایج

تایید انتقال ژن آپوپتین به داخل پلاسمید pCDH. پس از هضم آنزیمی پلاسمید pCDH، ژن آپوپتین را وارد پلاسمید کردیم. باندهای حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید در شکل A1 نشان داده شده است. در ادامه، برای تایید موفقیت انتقال ژن آپوپتین به داخل پلاسمید pCDH از تکنیک PCR (با استفاده از پرایم‌هایی که طراحی کرده بودیم) استفاده شد. نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصول PCR نشان داد که ژن آپوپتین به طور موفقیت‌آمیز در داخل پلاسمید pCDH کلون شده بود. باندهای حاصل از این آزمایش که مربوط به بیان کیفی ژن آپوپتین در داخل پلاسمید pCDH می‌باشد، در شکل B1 نشان داده شده است.

در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه plate ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. گروه‌های تیمار شده با ویروس با گروه‌های کنترل که ویروسی دریافت نکرده و گروهی که ویروس بدون آپوپتین دریافت کرده بودند، به عنوان کنترل منفی مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. شایان ذکر این‌که، به منظور بررسی صحت تست‌های انجام شده تمامی تست‌ها به صورت تریپلیکت ارزیابی شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real Time PCR. پس از تیمار سلول‌های KMM-1 با وکتور لنتی ویروسی به مدت ۴۸ ساعت، RNA طبق دستورالعمل کیت high pure RNA isolation kit (Roche) استخراج شده و به منظور تولید cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای سنتز cDNA از کیت Revertaid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher) استفاده شد؛ حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ میکرولیتر بوده و واکنش دمایی بدین صورت بود که به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه، ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و یک ساعت در دمای ۴۲ درجه انکوبه شدند. در نهایت، واکنش سنتز cDNA با ۵ دقیقه انکوباسیون در ۷۰ درجه خاتمه یافت. آزمایش Real-Time PCR در دستگاه (Roche) light-cycler و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول Syber (Takara) premix Ex Taq، ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایم‌های طراحی شده در این پژوهش که توالی آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است و ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۰ سیکل برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای بررسی قطعات بر روی ژل از مارکر DNA (biotech rabbit) 50bp و به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده از منحنی ذوب استفاده شد. تمامی واکنش‌ها به صورت دوتایی و دوبار مستقل تکرار شد و محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  به دست آمد.

جدول ۱. توالی پرایم‌های به کار رفته در آزمون Quantitative

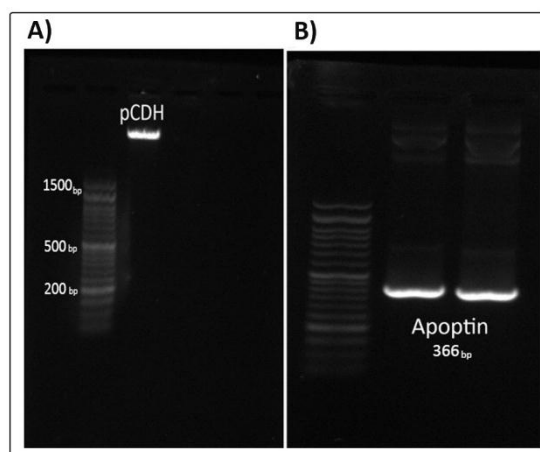
Real Time RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size (bp)
Apoptin	ACTCTATCGCTGTGTGGC	TCGCTTACCCTGACTCG	366
GAPDH	CGCTGGCATCCCTCAA	TCAGAACACGATGGCTGTAG	114

با MOI ۵ به مدت ۴۸ ساعت کشت دادیم. در ادامه و به منظور بررسی میزان ورود وکتور به داخل سلول‌های KMM-1 هم از میکروسکوپ فلورسنت و هم از تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. نتایج به دست آمده از مطالعه میکروسکوپی نشان‌دهنده آن بود که میزان سلول‌های GFP مثبت بعد از گذشت ۴۸ ساعت در سلول‌های KMM-1 در مقایسه با سلول‌های کنترل که با ویروس آلوده نشده بودند، به‌طور معنادار بیش‌تر بود (شکل A3). جالب توجه آن‌که مطالعه کمی بیان GFP با تکنیک فلوسیتومتری نیز تأییدکننده نتایج میکروسکوپی بود. همان‌طور که نتایج آنالیز فلوسیتومتری در شکل B3 نشان داده شده است بیان GFP در سلول‌های KMM-1 آلوده شده با ویروس به بیش از ۹۰٪ افزایش یافته بود.

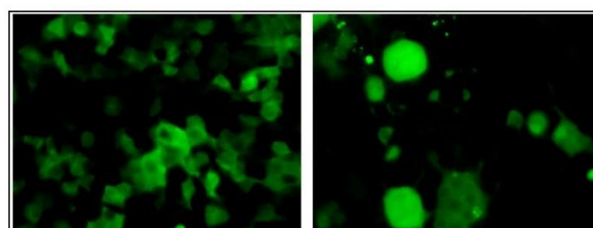
میزان بالای بیان ژن آپوپتین. برای بررسی بیان ژن آپوپتین پس از ورود وکتور لنتی‌ویروسی حاوی این ژن به داخل سلول‌های KMM-1، در ساعت ۴۸ و ۷۲ سلول‌ها جمع‌آوری شده و پس از استخراج RNA میزان بیان mRNA ژن آپوپتین با استفاده از Real time RT-PCR بررسی شد. نتایج به دست آمده بیانگر موفقیت‌آمیز بودن بیان این ژن متعاقب آلوده کردن سلول‌های KMM-1 با وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین بود. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است بیان ژن آپوپتین در سلول‌های آلوده‌شده با LV-GFP-Apoptin در مقایسه با ژن کنترل دارای افزایش معنادار می‌باشد؛ به‌طوری‌که در ۴۸ ساعت حدود ۳ برابر ( $P \leq 0.01$ ) و در ۷۲ ساعت تا حدود ۷ برابر ( $P < 0.001$ ) افزایش یافته است (شکل ۴).

تاثیر سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو بیان ژن آپوپتین در سلول‌های KMM-1. جهت بررسی تاثیر سایتوتوکسیک بیان ژن آپوپتین متعاقب تیمار سلول‌های KMM-1 با وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین از آزمون‌های تریپان‌بلو و MTT استفاده کردیم. نتایج حاصل از شمارش سلولی نشان داد که بیان ژن آپوپتین در رده سلولی مالتیپل میلوما دارای خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو بوده و تعداد سلول‌های زنده به صورت وابسته به زمان کاهش یافته‌اند (شکل A5). در تایید نتایج این آزمون، همان‌طور که در شکل B5 نشان داده شده است مشخص شد که فعالیت متابولیک سلول‌های تیمار شده با وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین نسبت به کنترل نیز به صورت وابسته به زمان کاهش می‌یابد. شایان ذکر است که جهت بررسی تاثیر ورود وکتور لنتی‌ویروسی به داخل سلول‌ها از وکتور بدون ژن آپوپتین نیز استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تیمار سلول‌ها با این وکتور تاثیر ناچیزی در فعالیت متابولیک و قدرت تکثیر سلول‌ها داشته است (شکل ۵).



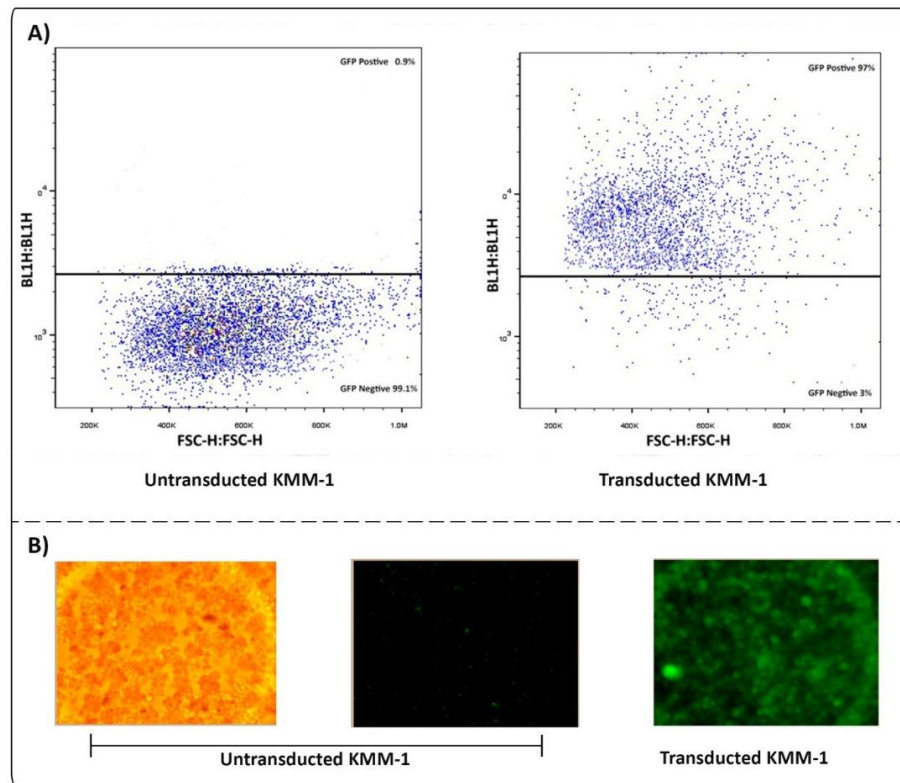
شکل ۱. (A) باند پلاسمید pCDH بعد از انجام هضم آنزیمی. (B) محصول PCR ژن آپوپتین کلون‌شده در پلاسمید pCDH.

تایید انتقال و بیان پلاسمیدهای لنتی‌ویروسی حاوی آپوپتین در سلول‌های HEK293T. پلاسمیدهای وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین را با استفاده از PolyFect transfection reagent به داخل سلول چسبنده HEK293T منتقل کرده و ورود آن را با بررسی میزان بیان GFP بررسی کردیم. نتایج به دست آمده از بررسی میکروسکوپی بیان GFP جهت تایید ورود پلاسمید به سلول HEK293T در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است ۴۸ ساعت پس از ورود پلاسمید به HEK293T شاهد تعداد بالای سلول‌های GFP مثبت می‌باشیم. لازم به ذکر است که پس از گذشت مدت زمان ۷۲ و ۹۶ ساعت از انتقال پلاسمیدها، ویروس ساخته‌شده را جهت انجام آزمایشات بعدی از مایع رویی محیط کشت برداشت و تغلیظ کردیم.

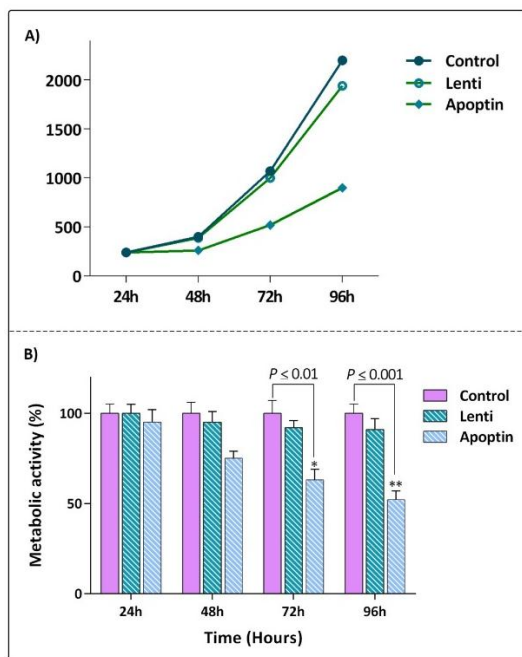


شکل ۲. سلول‌های GFP مثبت بعد از انتقال پلاسمید به سلول‌های HEK293T همان‌طور که مشخص است ۴۸ ساعت پس از ورود پلاسمید به سلول HEK293T شاهد بیان بالای GFP در سلول‌ها می‌باشیم.

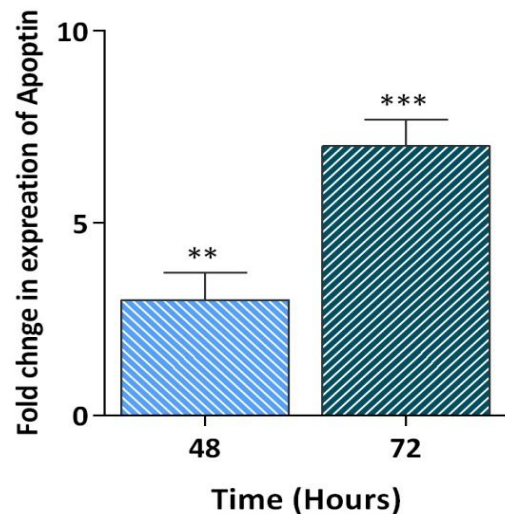
نتایج میزان ترانسداکشن و بیان وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین به داخل سلول‌های KMM-1. پس از برداشت ویروس‌های ساخته‌شده در سلول‌های HEK293T، تعداد ۵ هزار سلول KMM-1 را با وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین



شکل ۳. بررسی کمی و کیفی میزان ورود وکتور لنتی ویروسی به داخل سلول‌های KMM-1. (A) نتایج حاصل از میکروپ فلورسنت نشان‌دهنده میزان بالای بیان GFP است که حاکی از میزان آلودگی بالای سلول‌های سرطان KMM-1 با وکتور لنتی ویروسی ساخته شده است. (B) آنالیز فلوسایتومتری نیز تاییدکننده نتیجه میکروسکوپی بوده و بیانگر میزان بالای آلودگی سلول‌های KMM-1 با وکتور لنتی ویروسی است.



شکل ۴. بررسی بیان ژن آپوپتین بعد از ورود وکتور لنتی ویروسی بیان‌کننده ژن آپوپتین. جهت بررسی بیان ژن آپوپتین بعد از ورود وکتور به سلول‌ها در ساعت‌های ۴۸ و ۷۲ تست Real Time PCR انجام شد که نشان‌دهنده افزایش بیان ژن آپوپتین می‌باشد. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شده است. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف محاسبه شد (mean ± SD). P value کمتر از 0.05 نشانگر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود (\*\*، بیانگر  $P \leq 0.01$ ، \*\*\*، بیانگر  $P < 0.001$ ).



شکل ۵. تغییرات بیان ژن آپوپتین بعد از ورود وکتور لنتی ویروسی بیان‌کننده ژن آپوپتین. جهت بررسی بیان ژن آپوپتین بعد از ورود وکتور به سلول‌ها در ساعت‌های ۴۸ و ۷۲ تست Real Time PCR انجام شد که نشان‌دهنده افزایش بیان ژن آپوپتین می‌باشد. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده شده است. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف محاسبه شد (mean ± SD). P value کمتر از 0.05 نشانگر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود (\*\*، بیانگر  $P \leq 0.01$ ، \*\*\*، بیانگر  $P < 0.001$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

پیوند مغز استخوان به عنوان یکی از متداول‌ترین روش‌های درمانی برای مالیتیل‌میلوما معرفی شده و به دو روش اتولوگ و آلوگرافت انجام می‌شود. در روش آلوگرافت با مشکلاتی هم‌چون پیدا کردن دهنده مناسب و هم‌چنین عوارضی مانند GVHD روبرو هستیم [۲، ۱۴]. به همین دلیل استفاده از پیوند اتولوگ می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش آلوگرافت باشد، اما یکی از مشکلات عمده در پیوند اتولوگ امکان عود بیماری به دلیل آلوده بودن سلول‌های پیوندی با سلول‌های سرطانی است. جهت حل این مشکل می‌توان میزان آلودگی سلول‌های پیوندی را با روش‌های متفاوتی از جمله ژن‌تراپی کاهش داد [۱۳-۱۸]. چندین روش برای بیان پروتئین در داخل سلول‌ها وجود دارد که استفاده از وکتور لنتی‌ویروسی با توجه به مقاومت سلول‌های خونی به بسیاری از وکتورها، یکی از بهترین روش‌ها برای انتقال ژن به داخل این نوع سلول‌ها می‌باشد. وکتور لنتی‌ویروسی نه تنها سلول‌های در حال تکثیر را آلوده می‌کند، بلکه توانایی انتقال ژن به داخل سلول‌هایی بدون قدرت تکثیر را نیز دارد و به دلیل توانایی بالای نفوذ به داخل سلول‌های خونی یکی از مناسب‌ترین گزینه‌ها برای ژن‌تراپی در سرطان‌های هماتولوژیکی می‌باشد [۲۱-۱۹، ۵، ۴]. ما در این پژوهش استفاده از وکتور لنتی‌ویروسی برای انتقال ژن آپوپتین به داخل سلول‌های مشتق از مالیتیل‌میلوما را بررسی کردیم. نتایج حاصل از بررسی فلوسایتومتری و میکروسکوپی در این مطالعه نشان‌دهنده میزان بالای ورود وکتور لنتی‌ویروسی به داخل سلول‌های KMM-1 و متعاقباً افزایش چشمگیری در بیان ژن آپوپتین بود. نتایج این پژوهش با یافته‌های مطالعات پیشین که در آن با استفاده از وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ژن آپوپتین تواسه بودند پنبلی متشکل از سلول‌های رده لوسمی میلوبلاستیک حاد را به میزان بالایی آلوده کنند، مطابقت دارد [۲]. به طور کل، با در نظر گرفتن نتایج به دست‌آمده می‌توان نتیجه گرفت استفاده از این نوع وکتور ویروسی برای این رده سلولی موافقت‌آمیز بوده است.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن آپوپتین بر قدرت تکثیر سلول‌های KMM-1 حاکی از آن بود که با ورود LV-GFP Apoptin به داخل سلول توموری و بیان آن، توانایی تکثیر سلولی به‌صورت قابل توجه و به‌طور وابسته به زمان کاهش یافت. هم‌چنین، به منظور بررسی تاثیر بیان ژن آپوپتین بر فعالیت متابولیک سلول‌ها از تکنیک MTT استفاده شد. منطبق با نتایج تریپان‌بلو متوجه شدیم که بیان ژن آپوپتین در سلول‌های KMM-1 به صورت وابسته به زمان می‌تواند با مهار فعالیت متابولیک میزان بقا و زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش دهد. مشابه با نتایج حاصل از این مطالعه، پژوهشی توسط Jie Jiang و همکارانش

در سال ۲۰۱۰ انجام شد که در آن تاثیر منفی بیان ژن آپوپتین بر میزان بقا و زنده‌مانی برخی از سلول‌های توموری نشان داده شده است [۲]. در همین راستا مطالعات فراوان دیگری نیز به بررسی تاثیر سایتوکسیک بیان ژن آپوپتین در سلول‌های توموری از جمله سرطان سینه، پروستات، ریه، گلیوما پرداخته و نشان داده‌اند که بیان این ژن موجب القاء آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود [۲۲، ۲۸-۲۹]. اما مطالعه‌ای بر روی تاثیر بیان این ژن بر سلول‌های رده مالیتیل‌میلوما انجام نشده است. علاوه بر این، مطالعه پیشین بر روی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک نیز نشان داد که نه تنها وکتور لنتی‌ویروسی قدرت بالایی در نفوذ به سلول سرطانی دارد، بلکه بیان ژن آپوپتین می‌تواند به‌صورت چشمگیری مرگ سلولی را در این رده القاء کند [۲۹]. شایان ذکر است که نتایج به دست‌آمده نشان داد که تاثیر مهاری بیان ژن آپوپتین ناشی از خود وکتور ویروسی و بیان ژن GFP نبوده است؛ جهت اثبات این ادعا وکتور لنتی‌ویروسی بدون ژن آپوپتین طراحی و مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج حاصل از آن نشان داد که این وکتور تاثیر ناچیزی بر روی درصد زنده‌مانی سلول‌ها و فعالیت متابولیک داشته است. مطالعات بالینی و ژنتیکی صورت گرفته بر روی مکانیسم‌های پاتوژن مالیتیل‌میلوما اعلام می‌کنند که مسیر PI3K/Akt در این سرطان فعال بوده و به موجب آن Akt فسفریله در سیتوپلاسم تجمع می‌یابد. این تحقیقات هم‌چنین نشان می‌دهند که فعالیت این مسیر نه تنها باعث تقویت پتانسیل تکثیری سلول‌های لوسمی می‌شود، بلکه تاثیر به‌سزایی در ایجاد مقاومت نسبت به داروهای شیمی‌درمانی نیز می‌گذارد. از طرف دیگر، در مطالعات پیشین ثابت شده است آپوپتین وابسته به مسیر PI3K/Akt و با تجمع Akt در هسته و به تبع آن کاهش Akt فسفریله در سیتوپلاسم باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود [۸، ۳۰]. در همین راستا، مطالعه‌ای که توسط Zhou Danyang و همکارانش در سال ۲۰۱۸ انجام شد نشان داد آپوپتین از طریق مسیر PI3K و به واسطه کاهش p-Akt موجب آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده می‌شود [۳۱]. با توجه به مطالب ذکر شده و بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالاً مکانیسم عملکرد بیان ژن آپوپتین در سلول‌های مشتق شده از مالیتیل‌میلوما (KMM-1) وابسته به مسیر PI3K/Akt بوده و به واسطه تجمع Akt فسفریله در هسته باعث کاهش پتانسیل تکثیری سلول‌های KMM-1 شده است. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که یکی از بهترین روش‌ها برای انتقال ژن به داخل سلول‌های سرطان خون که مقاومت بالایی نسبت به انواع وکتورها دارند، استفاده از وکتور لنتی‌ویروسی است. در این پژوهش پس از انتقال ژن آپوپتین به‌وسیله وکتور لنتی‌ویروسی میزان بیان ژن آپوپتین به‌طور وابسته

stem cell transplantation in multiple myeloma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012; 4: e2012069.

[15] Avigan D, Hari P, Battiwalla M, Bishop MR, Giralt SA, Hardy NM, et al. Proceedings from the national cancer institute's Second International Workshop on the Biology, Prevention, and treatment of relapse after hematopoietic stem cell transplantation: part II. autologous transplantation — novel agents and immunomodulatory strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19: 1661-1669.

[16] Bock F, Lu G, Srour SA, Gaballa S, Lin HY, Baladandayuthapani V, et al. Outcome of patients with multiple myeloma and CKS1B gene amplification after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22: 2159-2164.

[17] Matsui W, Borrello I, Mitsiades C. Autologous stem cell transplantation and multiple myeloma cancer stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: S27-32.

[18] Mahajan S, Tandon N, Kumar S. The evolution of stem-cell transplantation in multiple myeloma. *Ther Adv Hematol* 2018; 9: 123-133.

[19] Chira S, Jackson CS, Oprea I, Ozturk F, Pepper MS, Diaconu I, et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget* 2015; 6: 30675-30703.

[20] Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, Tanuri A, Delgado-Cañedo A, Bonamino MH. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *J Transl Med* 2016; 14: 288.

[21] Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, Ferrua F, Cicalese MP, Baricordi C, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013; 341: 1233151.

[22] Zhang L, Zhao H, Cui Z, Lv Y, Zhang W, Ma X, et al. A peptide derived from apoptin inhibits glioma growth. *Oncotarget* 2017; 8: 31119-31132.

[23] Maddika S, Wiechec E, Ande SR, Poon IK, Fischer U, Wesselborg S, et al. Interaction with PI3-kinase contributes to the cytotoxic activity of Apoptin. *Oncogene* 2008; 27: 3060-3065.

[24] An S, Nam K, Choi S, Bai CZ, Lee Y, Park JS. Nonviral gene therapy in vivo with PAM-RG4/apoptin as a potential brain tumor therapeutic. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 821-834.

[25] Wu F, Liu Y, Li J, Hou L, Lei F, Huang S, et al. Human serum albumin-mediated apoptin delivery suppresses breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Lett* 2017; 13: 579-586.

[26] Du J, Zhang Y, Xu C, Xu X. Apoptin-modified human mesenchymal stem cells inhibit growth of lung carcinoma in nude mice. *Mol Med Rep* 2015; 12: 1023-1029.

[27] Mohammadi V, Behbahani AB, Rafiee GR, Hosseini SY3, Zarei MA, Okhovat MA, Takhshid MA. The effects of specific expression of apoptin under the control of PSES and PSA promoter on cell death and apoptosis of LNCaP cells. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20: 1354-1359.

[28] Agha Amiri S, Shahhosseini S, Zarei N, Khorasanizadeh D, Aminollahi E, Rezaie F, et al. A novel anti-CD22 scFv-apoptin fusion protein induces apoptosis in malignant B-cells. *AMB Express* 2017; 7: 112.

[29] Anjam najmedini A, et al. Design of lentiviral vector of apoptin and investigating its cytotoxic effect on reh acute lymphoblastic leukemia cells. *J Babol Univ Med Sci* 2018; 20: 48-53. (Persian).

[30] Lai GH, Lien YY, Lin MK, Cheng JH, Tzen JT, Sun FC, et al. VP2 of chicken anaemia virus interacts with apoptin for down-regulation of apoptosis through de-phosphorylated threonine 108 on apoptin. *Sci Rep* 2017; 7: 14799.

[31] Zhou D, Liu W, Liang S, Sun B, Liu A, Cui Z, et al. Apoptin-derived peptide reverses cisplatin resistance in gastric cancer through the PI3K-AKT signaling pathway. *Cancer Med* 2018; 7: 1369-1383.

به زمان افزایش یافته و بیان آن منجر به کاهش قدرت تکثیر و هم‌چنین مهار فعالیت متابولیک سلول‌ها شد. البته در این پژوهش نقش این ژن بر روی سلول‌های سالم مورد بررسی قرار نگرفت که با انجام تحقیقات بیش‌تر می‌توان به کسب نتایج بهتر امیدوار بود؛ باشد که بتوان در آینده نزدیک از بیان این ژن برای پاک‌سازی سلول‌های سرطانی در پیوند اتولوگ استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تأمین بودجه تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *Cancer J Clin* 2015; 65: 5-29.
- [2] Jiang J, Cole D, Westwood N, Macpherson L, Farzaneh F, Mufti G, Tavassoli M, Gäken J. Crucial roles for protein kinase C isoforms in tumor-specific killing by apoptin. *Cancer Res* 2010; 70: 7242-7252.
- [3] Yang H, Robinson SN, Nieto Y, Jones RJ, Gocke CD, Lu J, et al. Ex vivo graft purging and expansion of autologous blood progenitor cell products from patients with multiple myeloma. *Cancer Res* 2011; 71: 5040-5049.
- [4] Klimatcheva E, Rosenblatt JD, Planelles V. Lentiviral vectors and gene therapy. *Front Biosci* 1999; 4: D481-D496.
- [5] Amado RG, Chen IS. Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? *Science* 1999; 285: 674-676.
- [6] Danen-Van Oorschot AA, van der Eb AJ, Noteborn MH. BCL-2 stimulates Apoptin®-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 245-249.
- [7] Los M, Panigrahi S, Rashedi I, Mandal S, Stetefeld J, Essmann F, Schulze-Osthoff K. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1335-1342.
- [8] Maddika S, Bay GH, Krocak TJ, Ande SR, Maddika S, Wiechec E, et al. Akt is transferred to the nucleus of cells treated with apoptin, and it participates in apoptin-induced cell death. *Cell Prolif* 2007; 40: 835-848.
- [9] Taebunpakul P, Sayan BS, Flinterman M, Klanrit P, Gäken J, Odell EW, et al. Apoptin induces apoptosis by changing the equilibrium between the stability of TAp73 and ΔNp73 isoforms through ubiquitin ligase PIR2. *Apoptosis* 2012; 17: 762-776.
- [10] Zhou S, Zhang M, Zhang J, Shen H, Tangsakar E, Wang J. Mechanisms of Apoptin-induced cell death. *Med Oncol* 2012; 29: 2985-2991.
- [11] Shen Ni L, Allaudin ZN, Mohd Lila MA, Othman AM, Othman FB. Selective apoptosis induction in MCF-7 cell line by truncated minimal functional region of Apoptin. *BMC Cancer* 2013; 13: 488.
- [12] Jiang J, Cole D, Westwood N, Macpherson L, Farzaneh F, Mufti G, et al. Crucial roles for protein kinase C isoforms in tumor-specific killing by apoptin. *Cancer Res* 2010; 70: 7242-7252.
- [13] Krishnan AY1, Mei M, Sun CL, Thomas SH, Teh JB, Kang T, et al. Second primary malignancies after autologous hematopoietic cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19: 260-265.
- [14] Tosi P, Imola M, Mianulli AM, Tomassetti S, Merli A, Molinari A, et al. Update on the role of autologous hematopoietic



## Apoptotic effect of apoptin gene transduction on multiple myeloma cell line

Ali Anjam Najmedini (M.Sc)<sup>1</sup>, Rouhollah Vahabpour Roudsari (Ph.D)<sup>2</sup>, Atieh Pourbagheri-Sigaroodi (M.Sc)<sup>3</sup>, Soofia Sorourian (M.Sc)<sup>4</sup>, Davood Bashash (Ph.D)<sup>\*1</sup>

1 -Dept. of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 -Dept of Medical Lab Technology, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Dept of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran

4- Dept of Biotechnology, University of Mysore, India

\* Corresponding author. +98 21 22717504 d.bashash@sbmu.ac.ir

Received: 7 apr 2018; Accepted: 13 Oct 2018

**Introduction:** Following the first description of multiple myeloma (MM), as the second most prevalent hematologic malignancy, multiple promising advances have paved the way to increase the long-lasting complete remission for patients. In the era of the novel therapeutic approaches, the cloning of the apoptosis-inducing genes into the genome of malignant cells has attracted tremendous attention. In this study, we aimed to evaluate the anti-cancer effect of apoptin-expressing vector on multiple myeloma-derived KMM-1 cell line.

**Materials and Methods:** In this experimental study, we constructed the lenti-viral vector expressing apoptin for transferring this gene into KMM-1 cells. Transduction efficiency and apoptin gene expression were further confirmed by flow cytometric and quantitative real-time PCR analysis, respectively. Afterwards, the anti-survival effect of over-expressed apoptin on KMM-1 cells was also evaluated by applying MTT, and trypan blue assays.

**Results:** The results of flow cytometric analysis demonstrated that the apoptin-expressing vector was successfully transduced into KMM-1 cells, with the transduction efficiency of more than 90%. In addition, we found that the over-expression of apoptin, as revealed by 8-fold increase in its mRNA level, exerted a remarkable cytotoxic effect in MM cells. The resulting data declared that apoptin expression not only significantly reduced cell viability ( $P < 0.001$ ) but also potently halted KMM-1 metabolic activity ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** This study highlighted the promising anti-cancer effect of lenti-viral vector expressing apoptin in multiple myeloma that may be clinically accessible in the near future.

**Keywords:** Apoptin, KMM-1 cell line, Multiple myeloma