مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۴۰۰، دوره ۲۳، صفحه ۱۵۷-۱۵۰

اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک مهار c-Myc توسط 10058-F4 بر سلول های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد

محمد صیادی (PhD)[۱]، آوا صفراوغلی آذر (MSc)[۲]، داوود بشاش (PhD)[۲*]

۱-گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲-گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۹۸/۱۱/۲۰، اصلاح: ۹۹/۲/۲۸، پذیرش: ۹۹/۷/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: c-Myc نقش بسیار مهمی در کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلول ها بازی می کند. با توجه به دخالت C-Myc در تنظیم طیف گسترده ای از عملکردهای داخل سلولی و بر اساس نقش آن در پاتوژنز لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL)، در این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد لوسمی 10058-F4، به عنوان یک مهار کننده شناخته شده C-Myc، در سلول های HL-60 مشتق از APL انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک 10058-F4 در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، رده سلولی HL-60 (تهیه شده از انیستتو پاستور ایران) با دوزهای مختلف مهار کننده (۵۰، ۱۰۰،۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) تیمار گشته و سپس در فواصل زمانی ۲۴ و ۳۶ ساعت، درصد زنده مانی، شمارش سلولی، فعالیت متابولیک و القاء آپوپتوز به ترتیب بررسی گردید. علاوه بر این، برای بررسی مکانیسم های مولکولی عملکرد 10058-F4 تغییرات رونویسی از ژن های مرتبط با آپوپتوز به کمک روش Real-time PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که مهار c-Myc با استفاده از 10058-F4 در دوزهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار در ۲۴ ساعت به ترتیب موجب کاهش ۴±۳۸٪ و ۳/۲±۴۹٪ رشد سلول های HL-60 نسبت به گروه کنترل می‌گردد ($p<0/05$). همچنین اثرات سایتوتوکسیک دارو، ناشی از توقف سلول ها در فاز G1 و القاء آپوپتوز می باشد؛ چرا که درصد سلول های رنگ گرفته با Annexine/PI در سلول های تیمار شده با دوز ۱۰۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت، در مقایسه با گروه کنترل ۳۱٪ افزایش یافته بود ($p<0/05$).

نتیجه گیری: در این مطالعه، کارآمدی 10058-F4 در سلول های HL-60 کاملاً مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، c-Myc، 10058-F4، رده سلولی HL-60.

مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، گروهی هتروژن از بدخیمی های خونی است که در آن شاهد تکثیر افسار گسیخته سلول های نئوپلاستیک و تجمع بلاست های متوقف شده در مرحله ای از بلوغ و مقاوم به مرگ سلولی در مغز استخوان هستیم (۱). لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) ۱۵-۵ درصد لوسمی های میلوبلاستیک حاد را به خود اختصاص داده است و قادر است در صورت مقاومت به درمان و یا عود، درصد بالایی از مرگ و میر را برای مبتلایان به این بیماری رقم بزند. یکی از درمان های فعلی برای این بیماری استفاده از ATO (آرسنیک تری‌اکساید) می باشد که تا حد زیادی پوشش دهنده نقایص داروی ATRA در القاء آپوپتوز و ممانعت از بازگشت مجدد بیماری می باشد (۲). اما در عین حال ATO دارای عوارض جانبی چشمگیری در دوزهای بالا بوده و این دوزها لازمه اثر گذاری آن است (۳). تلاش ها برای گره گشایی از مکانیسم های مولکولی که در پدیده مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی و بروز عود سرطان نقش دارند، با سرعت بسیار زیادی در حال پیشرفت می‌باشد و یافته های اخیر در این زمینه نشان می‌دهند که یکی از مهم‌ترین ساز و کارهای دخیل در نامیرایی سلول‌های سرطانی و مقاومت نسبت به آپوپتوز فعالیت انکوپروتئین c-Myc می باشد (۴). c-Myc نقش بسیار مهمی در کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلول ها بازی می کند و بیان نابجای آن در بسیاری از سرطان های انسانی از جمله APL مشاهده می شود (۵). c-Myc با پروتئین دیگری به نام Max دایمر می شود تا بتواند به توالی خاصی بر روی DNA (E-box با موتیف مرکزی CACGTG) در قسمت پروموتر ژن های هدف خود اتصال یابد. بنابراین از طریق مهار کردن دایمریزاسیون c-Myc/Max می توان مانع اتصال c-Myc به DNA و در نتیجه مهار عملکرد آن شد (۶). به دلیل نقش مهم c-Myc در بقای سلول های سرطانی، مهار آن می تواند منجر به

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۹۹۰ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر داود بشاش
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه خون شناسی و بانک خون. تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴
E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]

تحلیل و از بین رفتن سلول های توموری شود.با توجه به ویژگی های انکوژنیک c-Myc، امروزه مهار این ژن در سرطان های مختلف مورد توجه قرار گرفته است و در همین راستا مهارکنندگان متعددی که c-Myc را مورد هدف قرار می دهند ساخته شده اند. در یک نگاه کلی به این مهارکنندگان، می توان گفت مهارکنندگان Myc به دو دسته مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می شوند که هر کدام از آنها انواع مختلفی دارند (۷).

10058-F4 طبق دسته بندی فوق از مهارکنندگان مستقیم Myc به شمار می رود (۸). این دارو از هترودایمریزاسیون c-Myc و Max جلوگیری کرده و در نتیجه از عملکرد آن جلوگیری می کند. تاکنون بررسی های گوناگونی در مورد تاثیر این ترکیب بر روی سلول های سرطانی مختلف صورت گرفته و نشان داده شده است که 10058-F4 موجب مهار تکثیر سلول های سرطانی کبد، پروستات و سینه می شود (۱۰و۹). با توجه به عوارض جانبی نگران کننده و نقص های موجود در داروهای فعلی مورد استفاده برای درمان APL و همچنین بیان انکوپروتئین c-Myc در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، لذا به نظر می رسد این بیماران کاندید مناسب برای درمان با مهار کننده c-Myc باشند. به این منظور و برای بررسی کارایی استفاده از استراتژی مهار c-Myc در بیماری APL، سلول های رده HL-60 با غلظت های متفاوت از داروی 10058-F4 تیمار شدند و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت و تیمار سلولی: در این مطالعه تجربی، پس از تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد IR.SBMU.RETECH.REC.1397.1012، سلول های HL-60 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) (تهیه شده از انیستتو پاستور ایران) در محیط کشت RPMI1640 (Gibco، آمریکا) همراه با ۱۰٪ FBS، U/ml ۱۰۰ پنی سیلین و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار دی اکسیدکربن ۵٪ نگه‌داری شدند. تیمار سلول های HL-60 با غلظت های مختلف 10058-F4 (۲۰۰-۵۰ میکرومولار) (Selleckchem, Germany) و در زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت صورت گرفت. در همه آزمایش ها، سلول های HL-60 کشت داده شده در محیط کشت RPMI1640، بدون تیمار با دارو به عنوان گروه کنترل تلقی گردید. تمامی آزمایش ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه گانه انجام شد.

آزمون تریپان‌بلو: جهت بررسی تأثیر داروی 10058-F4 بر میزان زنده مانی سلول ها، سلول های HL-60 به تعداد 5×10^5 cells/ml در حضور دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان‌بلو ۰/۴٪ مخلوط گشته، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه انکوبه و پس از آن شمارش شد. سلول هایی که این رنگ را جذب می نمایند، جزو سلول های مرده و سلول هایی که هیچ رنگی را به خود جذب نکرده اند، زنده محسوب می شوند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده مانی سلول ها محاسبه گردید:

میزان زنده مانی (٪)= تعداد سلول های زنده ÷ تعداد کل سلول ها × ۱۰۰

بررسی فعالیت متابولیک سلول ها با MTT assay: برای ارزیابی تأثیر داروی 10058-F4 بر فعالیت متابولیک سلول های HL-60، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای حاوی و فاقد دارو اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، به سلول های داخل پلیت محلول MTT (۵ mg/ml) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور g ۱۰۰۰به 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 ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری: به منظور بررسی تأثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده، 5×10^5 سلول در هرچاهک پلیت ۱۲ خانه ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت های مختلف از داروی 10058-F4 تیمار گردید. پس از شست و شوی سلول ها با بافر فسفات- سالین (PBS) و افزودن معرف های AnnexinV-FITC/PI (Roche، آلمان)، و بافر انکوباسیون، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی رنگ پذیری سلول ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (PartecPasIII) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار Flowjo 7.6.1 صورت گرفت.

بررسی میزان فعالیت چرخه سلولی: سلول های HL-60 در پلیت های ۶ خانه قرار گرفتند. سپس با 10058-F4 برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شده و پس از گذشت زمان انکوباسیون، سلول ها با دور rpm ۲۰۰۰ برای زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه، سلول ها در اتانول ۷۰٪ فیکس شده و در دمای C ۲۰- به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس µg/ml ۰/۵ از محلول RNase در PBS افزوده شده و بعد از افزودن PI به مقدار µg/ml ۵۰، محتویات DNA سلولی به وسیله فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و آنالیز آن از طریق نمودارهای به دست آمده صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳: برای بررسی این که آیا مرگ سلولی القاء شده توسط 10058-F4 در رده سلولی HL-60 وابسته به کاسپاز می‌باشد، فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳، توسط کیت کاسپاز ۳ (سیگما، آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون بر اساس تشخیص اسپکتوفتومتریک مولکول p-نیتروآنیلین (p-nitroanilim) (pNA) متصل به انتهای سوبسترای اختصاصی کاسپاز می‌باشد. سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از 10058-F4 و یا به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از زمان مورد نظر و سانتریفوژ با دور g ۶۰۰ برای مدت ۵ دقیقه، جهت لیز پلت سلولی، بافر لایزات به آن اضافه شد. مجدداً با دور g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر، ۵ میکروگرم از سوپرناتانت با ۸۵ میکرولیتر بافر assay به همراه ۱۰ میکرولیتر از سوبسترای کاسپاز ۳ به مدت ۲ ساعت در پلیت ۹۶ خانه انکوبه شد. شکست پپتید توسط کاسپاز ۳ منجر به آزاد شدن رنگ pNA می‌شود که با کمک اسپکتوفتومتر در طول موج nm ۴۰۵ قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: پس از تیمار سلول ها با دوز۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار 10055-F4، استخراج RNA پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از ترایزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]

اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه Nanodrop ND ۲۰۰۰ بررسی شد. جهت انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA (Takara، ژاپن) استفاده شد. جهت سنتز cDNA مطابق با بروشور، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

بررسی کمّی بیان ژن هایc-Myc، Bax و Bcl-2: برای بررسی کمّی بیان ژن های c-Myc، Bax و Bcl-2 آزمون quantitative Real time RT-PCR انجام شد. از ژن ABL به عنوان ژن HOUSKEEPING در فرآیند سنجش استفاده گردید. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرولیتر SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۷ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی گراد) و مرحله اتصال/ بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می باشد. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز آماری: تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل Mean±SD قید شدند. بعد از اطمینان از توزیع طبیعی داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk) و برابری واریانس ها با استفاده از آزمون لوین (Leven)، به منظور بررسی تغییرات بین گروهی از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey post-hoc test) استفاده گردید. محاسبات با استفاده از نرم افزار SPSS 23 انجام شد و p<۰/۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

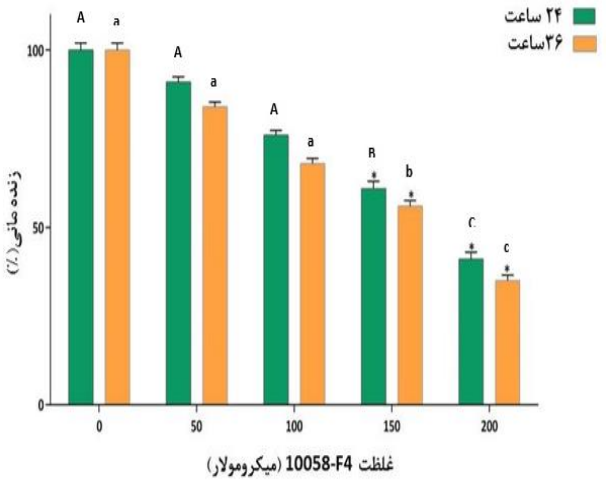
ژن	Accession number	آغازگر معکوس (5'-3')	آغازگر مستقیم (5'-3')	سایز (bp)
ABL	NM_005157	TCCTCGTCCTCCAGCTGTTA	ACCCGGAGCTTTTCACCTTT	218
c-Myc	NM_002467	CCACAGCAAACCTCCTCACAG	GCAGGATAGTCCTTCCGAGTG	105
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bcl-2	NM_000633	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	۲۴۹

یافته‌ها

10058-F4 سبب کاهش میزان زنده مانی سلول های HL-60 به صورت وابسته به دوز و زمان می شود: نتایج نشان داد که با افزایش دوز دارو و گذشت زمان، درصد زنده مانی سلول های HL-60 تیمارشده با دارو کاهش می یابد. علی رغم اینکه دوز ۵۰ میکرومولار از 10058-F4 اثر چشم گیری بر میزان زنده مانی سلول های HL-60 نمی گذارد، تیمار ۲۴ ساعته سلول ها با دوزهای بالاتر از این مهار کننده (۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) میزان زنده مانی را به ترتیب به میزان ۴±۳۸ و ۳/۲±۴۹ درصد کاهش می دهد (نمودار ۱). به طورکلی، این نتیجه بیانگر اثر سایتوتوکسیک این دارو به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول های رده HL-60 نسبت به گروه کنترل می باشد (p<۰/۰۵).

تیمار سلول های HL-60 با داروی10058-F4 منجر به کاهش میزان تکثیر سلول ها به صورت وابسته به دوز و زمان می شود: نتایج حاصل از شمارش سلول های زنده بعد از مواجهه با داروی 10058-F4 با انکوباسیون به مدت زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت نشان داد که این مهارکننده دارای اثرات ضد تکثیری روی سلول های مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می باشد. در مقایسه با گروه کنترل، تیمار سلول ها با دوزهای مختلف داروی 10058-F4 باعث شد تا شمارش سلول های زنده کاهش یابد (نمودار ۲). لازم به ذکر است که در تأیید نتایج به دست آمده از بررسی میزان زنده مانی سلول ها، داروی 10058-F4 در دوز ۲۰۰ میکرومولار پس از ۳۶ ساعت تعداد سلول ها به ۱۴۰۰۰±۳۷۰۰۰۰ رسیده است که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار می باشد (p<۰/۰۵) و در بین دوزهای استفاده شده بیشترین اثر را در کاهش تعداد سلول ها از خود نشان می دهد.

10058-F4 فعالیت متابولیک سلول های HL-60 را کاهش می دهد: فعالیت متابولیک سلول های پرومیلوسیتی که با تست MTT ارزیابی گردید، به صورت وابسته به دوز و زمان در مواجهه با دارو کاهش یافت. تیمار سلول ها با بالاترین دوز دارو (۲۰۰ میکرومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان ۳±۶۳٪ کاهش می دهد (p<۰/۰۵) (نمودار ۳). به علاوه، اثر مهاری با گذشت زمان بیشتر نیز می شود؛ به طوریکه پس از گذشت ۳۶ ساعت از تیمار سلول ها با دوز ۲۰۰ میکرومولار، فعالیت متابولیک سلول های HL-60 به میزان ۴±۷۶٪ کاهش یافت (p<۰/۰۵) (نمودار ۳).



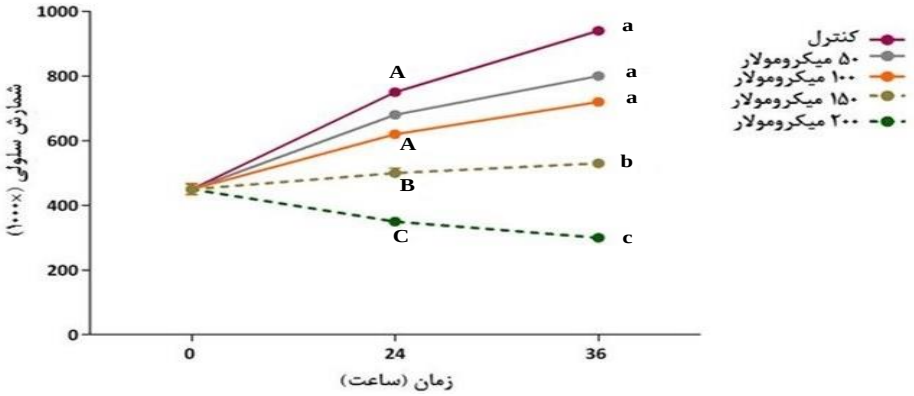
نمودار ۱. تأثیر داروی 10058-F4 بر میزان زنده مانی سلول های HL-60.
سلول ها با دوزهای مختلف 10058-F4 برای مدت زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار شدند، سپس میزان زنده مانی سلول ها به وسیله آزمون تریپان‌بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. (حروف بزرگ برای زمان ۲۴ ساعت و حروف کوچک برای زمان ۳۶ ساعت در نظر گرفته شده است)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]

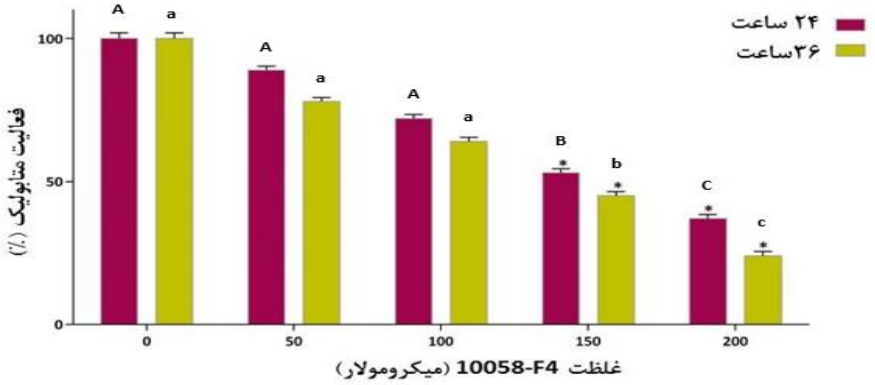
10058-F4 سبب افزایش جمعیت سلول های HL-60 در فاز G1 چرخه سلولی می شود: در این مطالعه نشان داده شد که مهار c-Myc در سلول ها توموری HL-60 موجب توقف پیشروی چرخه سلولی و در نتیجه تجمع جمعیت سلول ها در فاز G1 چرخه می شود (نمودار ۴). همچنین بررسی محتوای DNA سلولی آشکار ساخت که داروی 10058-F4 قادر است موجب افزایش تعداد سلول های حاضر در فاز Sub-G1 چرخه سلولی (بیانگر سلول های در حال مرگ) گردد. به طوریکه درصد این جمعیت سولی در دوز ۱۵۰ میکرومولار دارو در مقایسه با گروه کنترل از ۲/۲±۵/۹٪ به حدود ۳/۱±۲۵٪ افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

داروی 10058-F4 منجر به القاء آپوپتوز در سلول هایHL-60 می شود: بررسی میزان اکسترنالیزه شدن فسفاتیدیل سرین بر سطح سلول های تیمارشده با دارو و مقایسه آنها با گروه کنترل نشان داد که این دارو قادر به القاء آپوپتوز در رده سلولی HL-60 می باشد. مهار کننده c-Myc توانست در دوز ۱۵۰ میکرومولار میزان آپوپتوز را نسبت به گروه کنترل ۵ برابر کند (نمودار ۵). نتایج به دست آمده ثابت می نماید که داروی 10058-F4 با القاء آپوپتوز در سلول های HL-60 میزان بقاء این سلول ها را کاهش داده و بدین گونه اثر سایتوتوکسیک خود را اعمال می نماید. جهت بررسی این که آیا آپوپتوز القاء شده توسط مهار کننده c-Myc از طریق فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ صورت می‌گیرد، سلول‌های HL-60 با دوزهای مشابهی که برای آزمون Annexin/PI assay استفاده شده بود، تیمار گردید و پس گذشت ۲۴ ساعت میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ توسط کیت Caspase-3 assay مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون نیز نشان داد که مهار c-Myc در سلول‌های HL-60 با فعال شدن وابسته به دوز آنزیم کاسپاز ۳ همراه است (نمودار ۴) و احتمالاً مهار کننده c-Myc، آپوپتوز را در این رده سلولی از طریق مسیرهای وابسته به کاسپاز فعال می‌نمایند.

افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 به دنبال تیمار رده سلولی Hl-60 با 10058-F4: نتایج حاصل از آزمون quantitative Real time RT-PCR حاکی از آن است که تیمار سلول های HL-60 با 10058-F4 با افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax وکاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و c-Myc همراه می باشد. به دلیل افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول های مواجه شده با دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار نسبت به سلول های کنترل با افزایش همراه بوده است که خود را با افزایش میزان آپوپتوز نشان داده است (نمودار ۶).

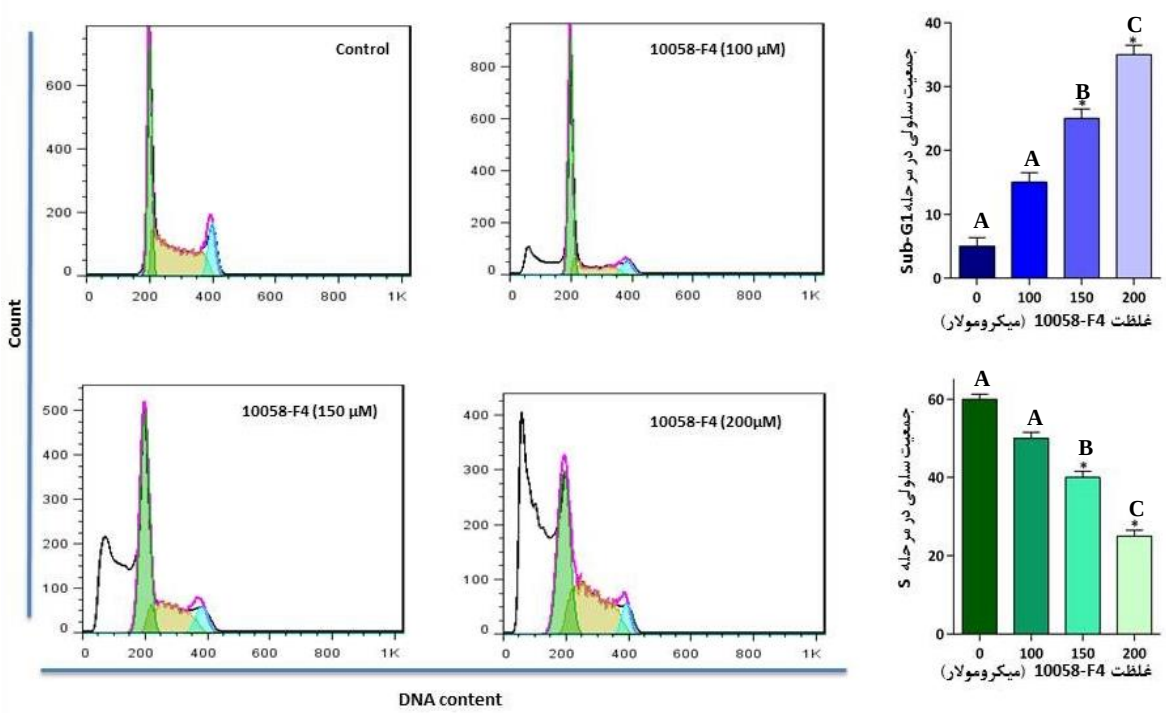


نمودار ۲. تأثیر وابسته به دوز و زمان داروی 10058-F4 بر شمارش سلولی در سلول های HL-60. سلول های HL-60 به تعداد 5×10^5 با غلظت های۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار از 10058-F4 تیمار شدند. همان گونه که در شکل مشاهده می شود، تیمار با 10058-F4 به صورت وابسته به دوز و زمان شمارش سلولی را کاهش داده است. (حروف بزرگ برای زمان ۲۴ ساعت و حروف کوچک برای زمان ۳۶ ساعت در نظر گرفته شده است).

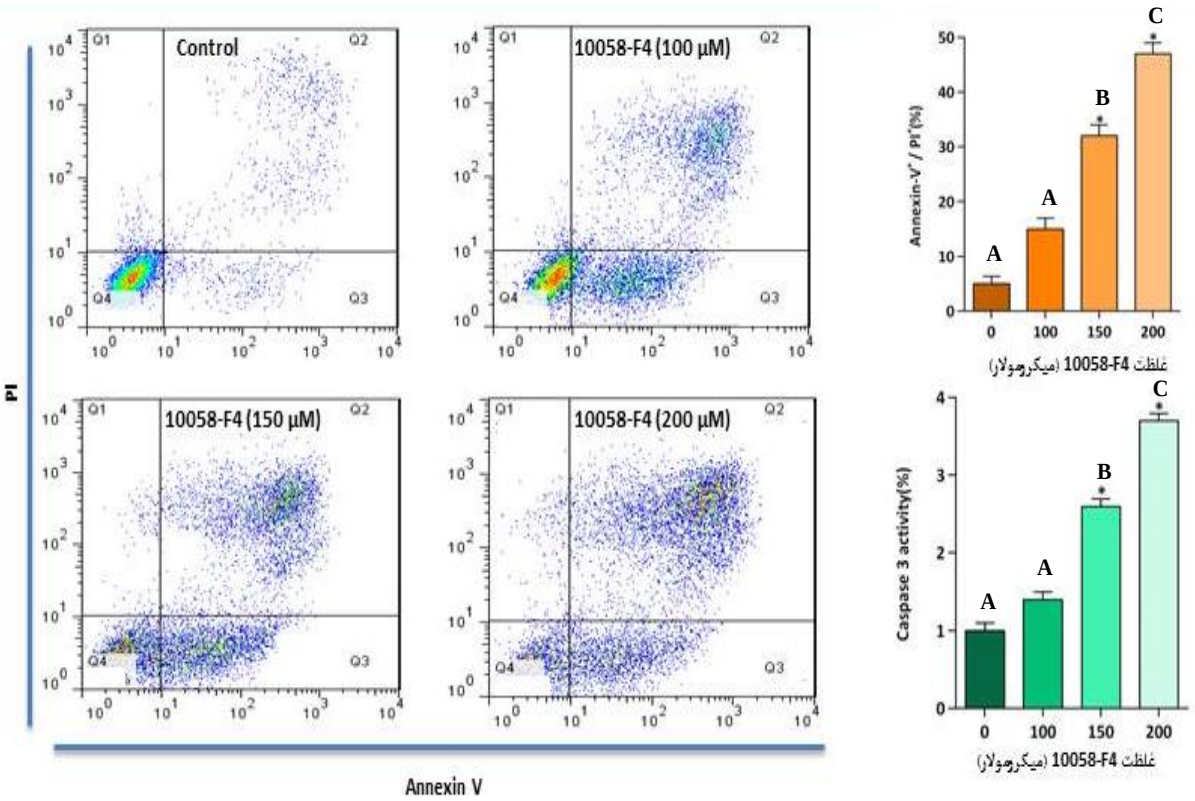


نمودار ۳. بررسی تأثیر داروی 10058-F4 بر فعالیت متابولیک سلولی HL-60. سلول ها در محیط حاوی دوزهای مختلف 10058-F4 برای مدت زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT برای آنها انجام شد. میزان IC_{50} در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۱۵۰ میکرومولار در طی ۳۶ ساعت تخمین زده می شود. (حروف بزرگ برای زمان ۲۴ ساعت و حروف کوچک برای زمان ۳۶ ساعت در نظر گرفته شده است).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]

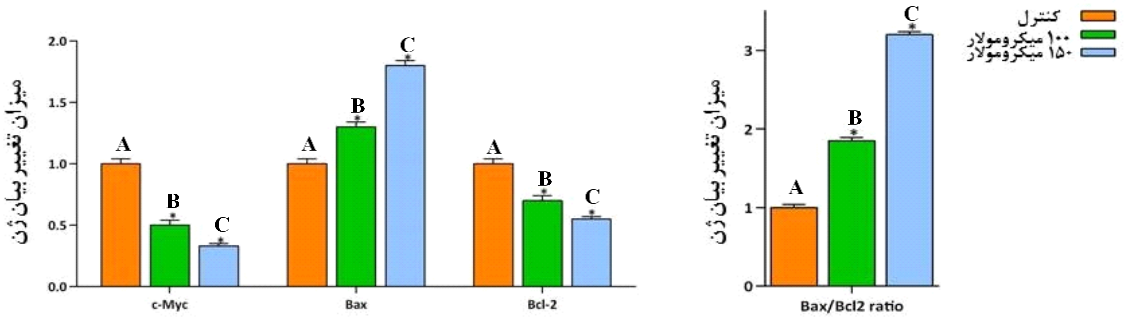


نمودار ۴. تاثیر 10058-F4 بر نحوه توزیع سلول های HL-60 در مراحل مختلف چرخه سلولی. نتایج فلوسایتومتریک بررسی نحوه توزیع سلول های تیمارشده با مهار کننده نشان داد که داروی 10058-F4 باعث افزایش سلول ها در فاز G1 و Sub-G1 چرخه سلولی می گردد.



نمودار ۵. بررسی درصد جمعیت سلول های آپوپتوز شده پس از تیمار با دوزهای مختلف 10058-F4. تیمار سلول های HL-60 با مهار کننده c-Myc باعث افزایش درصد جمعیت هر دو سلول های $Ann\text{-}V^{+}$ و $Ann\text{-}V/PI^{+}$ می شود. القاء آپوپتوز و فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ در رده سلولی HL-60 پس از تیمار با 10058-F4 مورد ارزیابی قرارگرفت.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]



نمودار ۶. افزایش میزان رونویسی از ژن پروآپوپتوتیک Bax و کاهش سطح mRNA ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و c-Myc طی تیمار ۲۴ ساعته سلول های HL-60. سلول ها با دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار 10058-F4 برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن های مورد نظر تحت آزمون Real-time PCR قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری

تمامی نتایج به دست آمده از این بررسی، تأییدکننده تاثیرگذاری داروی 10058-F4 (که نوعی مهارکننده c-Myc است) به عنوان یک داروی سایتوتوکسیک و آنتی پرولیفراتیو برای سلول های HL-60 مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می باشد. انکوژن c-Myc به عنوان یک فاکتور رونویسی مهم در بسیاری از فعالیت های فیزیولوژیک درون سلولی همچون تنظیم چرخه سلولی، پرولیفراسیون، تکثیر، بقا، آپوپتوز، رونویسی، ترجمه و متابولیسم سلولی نقش دارد. به طور مثال، c-Myc یکی از تنظیم کننده های اصلی ژن hTERT، از واحدهای کاتالیتیک آنزیم ریورس ترنس کریپتاز انسانی، می باشد که سبب افزایش بیان و فعالیت hTERT و در نتیجه تکثیر و بقای سلول های سرطانی می شود (۱۱). نتایج حاصل از تست های تریپان‌بلو و MTT نشان دادند، با افزایش دوز و زمان تیمار سلول ها با دارو، تکثیر سلولی و فعالیت متابولیک به شکل معنی داری کاهش می یابد؛ چنانچه دوز ۲۰۰ میکرومولار 10058-F4، ۲ تا ۳ برابر دوز ۵۰ میکرومولار از همین دارو موجب کاهش فعالیت متابولیک و تعداد سلول های زنده گشته است. همچنین دوز ۱۵۰ میکرومولار مهار کننده c-Myc با گذشت زمان از ۲۴ ساعت به ۳۶ ساعت میزان فعالیت متابولیک را از ۵۳٪ به ۴۴٪ کاهش داد. در مطالعه ای که توسط Lin و همکاران انجام شد در سل لاین های کارسینومای هپاتوسلولار 10058-F4 باعث القای آپوپتوز از طریق فعال سازی مسیر میتوکندریایی شده است (۱۲).

همچنین، در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که مهار عملکرد c-Myc از طریق کاهش سطح ROS به طور قابل توجهی تکثیر سلول های سرطانی تخمدان را کاهش می دهد (۱۶و۱۳). اگرچه خاصیت ضد سرطانی c-Myc در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است اما تعداد پژوهش هایی که تمرکز دقیقی بر روی مکانیسم مولکولی این مهار کننده داشته باشند، محدود می باشد (۱۳). فرار از مرگ برنامه ریزی شده سلولی، یکی از راه های بقاء سلول های توموری و ایجاد مقاومت دارویی در بیماران است. از جمله نشانه های سلول آپوپتوز شده می توان به جوانه زدن غشاء، کوچک شدن سلول، قطعه قطعه شدن هسته، فشرده شدن کروموزوم، تکه تکه شدن DNA و همچنین افزایش بروز فسفاتیدیل سرین بر سطح خارجی سلول اشاره کرد (۱۴) .برای ارزیابی میزان القاء آپوپتوز به واسطه تیمار سلول ها با 10058-F4، بروز سطحی فسفاتیدیل سرین با فلوسایتومتری بررسی شد که نتایج حاصله تأییدکننده این مطلب بود. به طوریکه میزان سلول های آپوپتوزشده در دوز ۲۰۰ میکرومولار از دارو به ۶۳٪ رسید. با توجه به مرتبط بودن مسیر c-Myc در پیشبرد تکثیر و چرخه سلولی انتظار می رود مهار آن موجب تغییراتی در این فرآیندها گردد. نتایج حاصل نشان داد که داروی 10058-F4 می تواند با مهار فعالیت متابولیک سلول ها و نگه داشتن آنها در Sub-G1 چرخه سلولی، علاوه بر کاهش تکثیر سلولی موجب فعال شدن مکانیسم های آپوپتوز در این رده سلولی شود. تعداد زیادی از پروتئین ها در پروسه آپوپتوز دخیل هستند که دو پروتئین Bax و Bcl-2 از جمله مهم‌ترین آنها می باشند که به طور مستقیم و یا غیر مستقیم توسط c-Myc تنظیم می گردد (۱۵).

بر خلاف Bax که پروتئینی پروآپوپتوتیک می‌باشد، Bcl-2 آنتی‌آپوپتوتیک بوده و کاهش آن سبب راه اندازی مسیر آپوپتوز می گردد. در نتیجه بر هم خوردن توازن بین این دو پروتئین، یعنی افزایش Bax نسبت به Bcl-2 انتظار می رود که سلول به سمت آپوپتوز پیش روی نماید (۱۶). با توجه به آنکه در این مطالعه پس از تیمار سلول های توموری HL-60 با دوز ۱۵۰ میکرومولار میزان بیان Bax معادل ۳/۲۱ برابر میزان بیان Bcl-2 گشت، احتمال می رود که داروی 10058-F4 از طریق تغییر بیان این ژن ها سلول های رده لوسمی پرومیلوسیتیک حاد را به سوی مرگ سلولی سوق داده باشد.

از مجموع اطلاعات حاصل از این پژوهش می توان چنین برداشت کرد که مهار c-Myc با استفاده از داروی 10058-F4 می تواند منجر به القاء آپوپتوز در سلول های توموری HL-60 شده و به دنبال آن از میزان تکثیر و بقاء این سلول ها بکاهد. این امیدواری وجود دارد که با وجود عوارض جانبی بسیار اندک از 10058-F4 به عنوان دارویی جدید در عرصه درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد بتوان استفاده کرد. البته بدیهی است همچنان نیاز به بررسی بیشتر در رابطه با چگونگی عملکرد و تأثیرات بالینی این دارو در درمان این بدخیمی وجود دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تامین بودجه تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]

Cytotoxic and Apoptotic Effects of C-Myc Inhibition by 10058-F4 on Acute Promyelocytic Leukemia Cells

M. Sayyadi (PhD)[1], A. Safaroghli-Azar (MSc)[2], D. Bashash (PhD)[*2]

1.Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

2.Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 23; 2021; PP: 150-157

Received: Feb 9th 2020, Revised: May 17th 2020, Accepted: Oct 10th 2020.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: C-Myc plays a very important role in controlling cell proliferation, apoptosis and differentiation. Due to the involvement of c-Myc in the regulation of a wide range of intracellular functions and based on its role in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia (APL), the present study was conducted to investigate the anti-leukemia effect of 10058-F4, as a known c-Myc inhibitor, on APL-derived HL-60 cells.

METHODS: In this experimental study, to evaluate the cytotoxic effects of 10058-F4 in acute promyelocytic leukemia, HL-60 cell line (prepared from Pasteur Institute of Iran) was treated with different doses of inhibitor (50, 100, 150 and 200 µM) and then in 24 -and 36- hours intervals, survival rate, cell count, metabolic activity and induction of apoptosis were respectively evaluated. In addition, transcriptional changes of apoptosis-related genes were studied by real-time PCR to investigate the molecular mechanisms of function of 10058-F4.

FINDINGS: The results showed that inhibition of c-Myc by 10058-F4 at doses of 150 and 200 µM in 24 hours reduced the growth of HL-60 cells by 38±4% and 49±3.2%, respectively, compared to the control group ($p<0.05$). In addition, the cytotoxic effects of the drug are due to the arrest of cells in the G1 phase and the induction of apoptosis; Because the percentage of cells stained with Annexin V/PI in cells treated at a dose of 100 µM after 24 hours increased by 31% compared to the control group ($p<0.05$).

CONCLUSION: In this study, the efficacy of 10058-F4 in HL-60 cells was fully established.

KEY WORDS: *Acute Promyelocytic Leukemia, C-Myc, 10058-F4, HL-60 Cell Line.*

Please cite this article as follows:

Sayyadi M, Safaroghli-Azar A, Bashash D. Cytotoxic and Apoptotic Effects of C-Myc Inhibition by 10058-F4 on Acute Promyelocytic Leukemia Cells. J Babol Univ Med Sci. 2021; 23: 150-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]

[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]

[*]Corresponding Author: D. Bashash (PhD)

Address: Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 22717504

E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

References

1.Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. J Clin Oncol. 2017;35(9):934-46.

2.Razani E, Bayati S, Safaroghli Azar A, Bashash D, Ghafari AH. Anti-cancer effect of aprepitant on Nb4 leukemic cells. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(10):28-34. [In Persian]

3.Cicconi L, Fenaux P, Kantarjian H, Tallman M, Sanz MA, Lo-Coco F. Molecular remission as a therapeutic objective in acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 2018;32(8):1671-8.

4.Bashash D, Sayyadi M, Safaroghli-Azar A, Sheikh-Zeineddini N, Riyahi N, Momeny M. Small molecule inhibitor of c-Myc 10058-F4 inhibits proliferation and induces apoptosis in acute leukemia cells, irrespective of PTEN status. Int J Biochem Cell Biol. 2019;108:7-16.

5.Ding Y, Wang Z-c, Zheng Y, Hu Z, Li Y, Luo D-f, et al. C-Myc functions as a competing endogenous RNA in acute promyelocytic leukemia. Oncotarget. 2016;7(35):56422-30.

6.Pérez-Olivares M, Trento A, Rodriguez-Acebes S, González-Acosta D, Fernández-Antorán D, Román-García S, et al. Functional interplay between c-Myc and Max in B lymphocyte differentiation. EMBO Rep. 2018;19(10):e45770.

7.Petrich AM, Nabhan C, Smith SM. MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. Cancer. 2014;120(24):3884-95.

8.Kleszcz R, Paluszczak J, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. The inhibition of c-MYC transcription factor modulates the expression of glycolytic and glutaminolytic enzymes in FaDu hypopharyngeal carcinoma cells. Adv Clin Exp Med. 2018;27(6):735-42.

9.Riyahi N, Safaroghli-Azar A, Sheikh-Zeineddini N, Sayyadi M, Bashash D. Synergistic Effects of PI3K and c-Myc Co-targeting in Acute Leukemia: Shedding New Light on Resistance to Selective PI3K-δ Inhibitor CAL-101. Cancer Invest. 2019;37(7):311-24.

10.Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. BMC Cancer. 2010;10:248.

11.Sheikh-Zeineddini N, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Riyahi N, Manafi Shabestari R, Janzamin E, et al. Suppression of c-Myc using 10058-F4 exerts caspase-3-dependent apoptosis and intensifies the antileukemic effect of vincristine in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. J Cell Biochem. 2019;120(8):14004-16.

12.Lin C-P, Liu J-D, Chow J-M, Liu C-R, Liu HE. Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. Anticancer Drugs. 2007;18(2):161-70.

13.Wang J, Ma X, Jones HM, Chan LL-Y, Song F, Zhang W, et al. Evaluation of the antitumor effects of c-Myc-Max heterodimerization inhibitor 100258-F4 in ovarian cancer cells. J Transl Med. 2014;12(1):226.

14.Cory S. Phosphatidylserine hide-and-seek. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(48):12092-4.

15.Lin X, Sun R, Zhao X, Zhu D, Zhao X, Gu Q, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. J Mol Med (Berl). 2017;95(1):53-67.

16.Sadri MR, Safaroghli Azar A, Kazemi AR, Hamidpour M, Allahbakhshian Frasani M, Bashash D. Apoptotic Effect of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition on Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Using Buparlisib. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(5):7-13. [In Persian]

[DOR: 20.1001.1.15614107.1400.23.1.23.2]
[DOI: 10.22088/jbums.23.1.150]