Original Article

The Effect of Telomerase Inhibition on the Expression of Inflammatory Cytokines Affecting the Pathogenesis of Multiple Myeloma Cell Line U266

Saeedeh Ghiyassi[1], Zahra Ameri[1], Rouhollah Mirzaei[1], Gholamhossein Hassanshahi[2], Mohsen Ehsan[1], Shima Kazemzadeh[3], Noushin Pouryazdanpanah[1], Ahmad Fatemi[1]*

[1]*Department of Hematology, Faculty of Paramedicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.*

[2]*Cellular & Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.*

[3]*Department of Hematology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Ahmad Fatemi,** Department of Hematology, Faculty of Paramedicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Email: ahmad.fatemi2@gmail.com

Received: 28 May, 2017

Accepted: 16 Jul, 2017

Abstract

Background and Objectives: Telomerase is an enzyme, which is overexpressed in 80-90% of cancers. Simultaneous activities of telomerase and NF-κB are required for progression of many cancers. In recent years, researchers have found out a close relationship between telomerase and the transcription factor NF-κB. Increased expression of telomerase is associated with significant increases in the expression level of NF-κB and endogenous genes, such as IL-6 and TNF-α. In recent years, several methods have been proposed to inhibit telomerase in cancer cells. Therefore, If it is possible to inhibit telomerase activity and consequently reduce the expression of inflammatory cytokines, the NF-κB signaling pathway, and the expression of target genes in the multiple myeloma disease. In this study, the effect of MST-312 (a derivative of green tea) with telomerase inhibition activity, was investigated on the treated U266 cell line and the expression of inflammatory cytokines.

Methods: In this experimental study, U266 cells, were treated with different dosed of MST-312 for 48 hours, and cellular apoptosis, was assessed by Annexin V Apoptosis Detection Kit. Then, to assess the expression of IL-6 and TNF-α genes, cells were treated with MST-312 (2μM for 48 hours) and the RNA of these cells, was extracted. In the following, real-time PCR method was used to investigate gene expression level.

Results: In this study, an increase in apoptosis and a decrease in the expression of IL-6 and TNF-α genes in U266 cells, was observed after 48 hours of exposure with 2μM MST-312. In addition, no cytotoxic effect was observed on normal blood mononuclear cells.

Conclusion: The results of the present study indicated that inhibition of telomerase activity by MST-312, can be considered as a novel treatment strategy for multiple myeloma.

Keywords: Multiple myeloma; Tumor necrosis factor-alpha; Interleukin-6; MST-312.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم، شماره چهارم، تیر ۹۷
صفحه ۱ الی ۹

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر مهارکننده تلومراز بر روی بیان سایتوکاین‌های التهابی مؤثر در پاتوژنز میلوم‌مولتیپل، در رده سلولی میلومی U266

سعیده غیاثی[۱]، زهرا عامری[۱]، روح‌اله میرزایی[۱]، غلامحسین حسن‌شاهی[۲]، محسن احسان[۱]، شیما کاظم‌زاده[۳]، نوشین پوریزدان‌پناه[۱]، احمد فاطمی[۱*]

[۱]گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

[۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.

[۳]گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
احمد فاطمی، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
ahmad.fatemi2@gmail.com

تاریخ دریافت:۹۶/۳/۷

تاریخ پذیرش:۹۶/۴/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: تلومراز آنزیمی است که در ۹۰-۸۰٪ سرطان‌ها افزایش بیان دارد. فعالیت همزمان تلومراز و NF-Kb برای پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها ضروری است. محققین در سال‌های اخیر به ارتباط تنگاتنگ تلومراز با فاکتور رونویسی NF-κB پی برده‌اند. با افزایش بیان تلومراز، افزایش قابل‌توجهی در بیان NF-κB و ژن‌های هدف، ازجمله IL-6 و TNFα مشاهده می‌شود. در سال‌های اخیر روش‌های متعددی جهت مهار تلومراز در سلول‌های سرطانی ارائه شده است. بنابراین، اگر بتوان با مهار تلومراز بیان سایتوکاین‌های التهابی، مسیر سیگنالینگ NF-κB و بیان ژن‌های هدف آن را در بیماری مالتیپل‌میلوما کاهش داد، گامی مؤثر در درمان این بدخیمی برداشته شده است. در این مطالعه MST-312 (مشتقی از چای‌سبز) با خاصیت مهارکنندگی تلومراز بر روی رده سلولی U266 تیمارشده و بیان سایتوکاین‌های التهابی بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های U266 با دوزهای مختلف MST-312، به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و آپوپتوز سلولی با استفاده از کیت انکسین V بررسی گردید، سپس برای مطالعه بیان ژن‌های IL-6 و TNFα، سلول‌ها (با دوز ۲ میکرومولار به مدت ۴۸ ساعت) با داروی MST-312 مجاور و RNA این سلول‌ها استخراج شد. در ادامه، میزان بیان ژن با روش Real Time PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه، افزایش آپوپتوز و کاهش بیان ژن‌های IL-6 و TNFα در سلول‌های U266 بعد از مواجه ۴۸ ساعته با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 مشاهده گردید. همچنین هیچ اثر سیتوتوکسیکی بر روی سلول‌های نرمال تک‌هسته‌ای خون دیده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد مهار فعالیت تلومراز به‌وسیله MST-312 می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد جدید برای درمان مالتیپل‌میلوما در نظرگرفته شود.

کلید واژه‌ها: مالتیپل‌میلوما؛ تومور نکروزینگ فاکتور آلفا؛ اینترلوکین - ۶؛ MST-312.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Ghiyassi S, Ameri Z, Mirzaei R, Hassanshahi Gh, Ehsan M, Kazemzadeh Sh, et al. The Effect of telomerase inhibition on the expression of inflammatory cytokines affecting the pathogenesis of multiple myeloma cell line U266. Qom Univ Med Sci J 2018;12(4):1-9. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

مقدمه

مالتیپل‌میلوما (Multiple Myeloma, MM)، دومین بدخیمی هماتولوژیک است که ۱۵-۱۰٪ بیماری‌های خونی را شامل می‌شود. در حالت نرمال، پلاسماسل آخرین سلول رده لنفوسیت B بوده که در تولید آنتی‌بادی نقش دارد، اما تکثیر خارج از کنترل آن‌ها در بیماری مالتیپل‌میلوما منجر به دردهای استخوانی، عفونت، کم‌خونی، شکستگی‌های استخوانی، همچنین افزایش سطح کلسیم خون می‌گردد. متوسط بقا در این بیماری قبل از شروع شیمی‌درمانی، حدود ۷ ماه است. یکی از علل اصلی بدخیم‌شدن سلول‌ها، اختلال در مسیر سیگنال‌دهی NF-κB است (۱). فاکتور رونویسی NF-κB نقش مهمی در بقا و تکثیر انواع مختلف تومورهای لنفوسیت B، به‌ویژه MM دارد. اینترلوکین - ۶ (IL-6)، فاکتور رشد اصلی پلاسماسل‌های بدخیم بوده که باعث بقای سلول‌های توموری و مقاومت به آپوپتوز این سلول‌ها در MM می‌شود. این سایتوکاین با دیگر فاکتورهای دخیل در پاتوژنز MM مانند ژن‌های سرکوب‌کننده تومور و انکوژن‌ها برهمکنش دارد. همچنین در پروموتور ژن اینترلوکین - ۶، ناحیه‌ای برای اتصال فاکتور رونویسی NF-κB مشاهده می‌شود (۲). از طرفی، NF-κB منجر به تولید انواع مختلفی از میانجی‌های التهابی، ازجمله TNFα می‌گردد (۳). فاکتور نکروزدهنده تومور (TNFα)، سایتوکاینی التهابی است که در بسیاری از فعالیت‌های سلولی نظیر تکثیر، آپوپتوز و پیام‌های بقا نقش دارد (۴)، و این پیام، بقا را از طریق فعالیت NF-κB میانجی‌گری می‌کند (۵). تحقیقات نشان داده‌اند TNFα با فعال‌کردن مسیر NF-κB در سلول‌های میلومی باعث افزایش تکثیر سلولی می‌شود. همچنین افزایش سطح TNFα در بیماران مبتلا به MM با شدت بیماری مرتبط است (۶). از سویی، TNFα منجر به فعال شدن NF-κB و افزایش ۵ برابری اینترلوکین - ۶ می‌گردد (۷).

تلومراز، عامل دیگر دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی (آنزیمی با دو زیرواحد کاتالیتیک TERT و دو زیرواحد ریبونوکلئوتیدی TERC) باعث افزایش طول تلومر در انتهای کروموزم‌ها می‌شود (۸). تلومراز آنزیمی است که در ۹۰-۸۰٪ سرطان‌ها بیان می‌گردد؛ درصورتی‌که در حالت طبیعی صرفاً سلول‌های بنیادی و جنسی دارای تلومراز فعال هستند.

سلول‌های توموری با فعالیت تلومرازی بالا، ویژگی‌هایی چون افزایش تکثیر، مقاومت به درمان، تهاجم و کاهش آپوپتوز را نشان می‌دهند. اما اخیراً مطالعات، پرده از نقش‌های غیرتلومریک تلومراز برداشته‌اند. فعال‌شدن تلومراز و NF-κB، نقشی اساسی در بسیاری ازسرطان‌ها دارند. بیان نابجای تلومراز منجر به افزایش سطح بیان NF-κB و ژن‌های هدف آن می‌شود (۹).

مطالعات نشان داده است تنظیم بیان ژن به‌واسطه تلومراز برای اینترلوکین - ۶ و TNFα، اختصاصی است؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد مهار همزمان تلومراز و NF-κB، استراتژی درمانی خوبی در بدخیمی‌ها باشد. از آنجا که درمان‌های رایج کنونی برای این بیماری دارای عوارض جانبی متعدد بوده و باوجود این داروها، MM همچنان به‌عنوان بدخیمی غیرقابل‌درمان محسوب می‌شود، لذا نیاز به شناخت داروهای جدیدتر احساس می‌گردد. در این میان، روش‌های مختلفی تاکنون جهت مهار عوامل متعدد دخیل در سیگنالینگ سلولی، ازجمله مهار فعالیت تلومرازی مطرح است (۹). از آنجایی‌که داروهای با منشأ شیمیایی دارای سازگاری کمتری با بدن انسان نسبت به داروهای با منشأ گیاهی هستند؛ بنابراین داروهای گیاهی امروزه جهت تحقیقات در زمینه شیمی‌درمانی بیشتر مورد توجه‌اند (۱۰). نتایج مطالعات پیشین حاکی از اثرات ضدسرطانی ترکیبات کاتچین می‌باشد. این تحقیقات نشان داده‌اند اپی‌گالو کاتچین گالات (EGCG)، کاتچین اصلی چای سبز، به‌طور قوی و مستقیم باعث مهار تلومراز می‌شود. داروی MST-312 (مشتقی از اپی‌گالو کاتچین) در مهار تلومراز مؤثرتر از ترکیب اصلی، یعنی اپی‌گالو کاتچین عمل می‌کند. این ترکیبات، امید را برای درمان سرطان در میان دانشمندان زنده کرده‌اند (۱۱). همچنین به‌طور شگفت‌انگیز، این دارو بر روی سلول‌های نرمال خونی (سلول‌های تک‌هسته‌ای خون) هیچ‌گونه اثر سویی ندارد (۱). این تحقیق با هدف بررسی اثر مهارکننده تلومراز بر روی بیان سایتوکاین‌های التهابی مؤثر در پاتوژنز میلوم‌مولتیپل در رده سلولی میلومی U266 انجام گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، رده سلولی U266 (مربوط به بیماری مالتیپل‌میلوما) از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه و سلول‌های U266

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با سرم جنین گاوی (FBS 10%)، پنی‌سیلین (۱۱۰ یونیت برمیلی‌لیتر) – استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر)، در انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، هوای حاوی ۵٪ دی‌اکسید کربن و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند.

محلول ذخیره MST-312 (Sigma-Aldrich, USA) با حل‌کردن آن در DMSO تهیه و غلظت‌های مناسب محلول کار از محلول ذخیره با استفاده از محیط کشت ساخته شد. تأثیر MST-312 روی مرگ سلول‌های میلومی با استفاده از آنالیز آپوپتوز بررسی گردید. به‌طور خلاصه، سلول‌های U266 در پلیت کشت سلول ۱۲خانه‌ای (با تراکم 2×10^5 سلول در هر خانه) کشت داده شدند و با غلظت‌های مورد نظر (۲، ۴ و ۸ میکرومولار) MST-312 به‌مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. نمونه سلولی که مورد تیمار با MST-312 قرار نگرفت (غلظت صفر)، به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. بعد از اتمام انکوباسیون، سلول‌ها دو مرتبه با PBS شسته و با استفاده از کیت آنکسین V شناسایی‌کننده آپوپتوز، (BD Biosciences, USA) رنگ شدند. پس از خالی‌کردن PBS رویی، به هر پک سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر بایندینگ بافر (1X)، ۵ میکرولیتر آنکسین PE-V و ۵ میکرولیتر محلول رنگ 7AAD اضافه شد. پس از یک ورتکس ملایم، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، ۴۰۰ میکرولیتر بایندینگ بافر (1X) به سوسپانسیون سلولی اضافه و با دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson FACS) آنالیز گردید. درصد سلول‌های آپوپتوزی با استفاده از نرم‌افزار Cell Ques تعیین شدند. هر آزمایش ۳ مرتبه تکرار شد و سلول‌هایی با آنکسین V مثبت و 7AAD منفی، در فاز اولیه آپوپتوز در نظر گرفته شدند و سلول‌هایی که هم آنکسین V و هم 7AAD مثبت داشتند در مراحل انتهایی، آپوپتوز تلقی شدند. بعد از انجام روش فلوسایتومتری، سلول‌های میلومی (U266) برای ۴۸ ساعت با داروی MST-312 (۲ میکرومولار) تیمار شده و RNA این سلول‌ها با استفاده از محلول TriPure (Roche) با توجه به دستور کارخانه استخراج گردید.

واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل

(Revert Aid First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis kit from Fermentas) از فرمنتاز تهیه شد. ۲۰ میکرولیتر در هر واکنش حاوی ۹ میکرولیتر آب تهی از نوکلئاز، ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم هگزامر، ۴ میکرولیتر Reaction Buffer ×5، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (10mM)، ۱ میکرولیتر RiboLock RNase Inhibitor (20U/µl) و ۱ میکرولیتر ترانسکریپتاز معکوس RevertAid M-MuLV (200U/µl) به‌عنوان مسترمیکس و ۲ میکرولیتر از RNA توتال (۱ میکروگرم در هر واکنش) به مسترمیکس اولیه اضافه شد. برای سنتز cDNA، هر واکنش ۲۰ میکرولیتری با برنامه دمایی زیر در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت:

پنج دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد و در پی آن ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. واکنش با حرارت دادن آن در ۷۰ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه خاتمه یافت.

واکنش Real-time PCR با استفاده از ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس گرین 2× (Ampliqon)، ۱/۵ میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای Forward و Reverse (10pmol)، ۴ میکرولیتر آب با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های دمایی شامل: مرحله فعال‌سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه با ۴۰ سیکل دمایی که هر چرخه دارای مرحله دناتوراسیون با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و یک مرحله ادغامی اتصال پرایمر و مرحله طویل‌سازی (annealing/ elongation) در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه بود. واکنش در دستگاه ABI Biosystem انجام شد. برای تأیید اختصاصی‌بودن محصولات تولیدشده، آنالیز منحنی ذوب صورت گرفت و از ژن GAPDH به‌عنوان ژن Housekeeping جهت نرمالیزه‌کردن نتایج بیان ژن‌ها استفاده شد. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta CT$ طبق فرمول: $2^{\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید و بیان هر ژن سه بار تکرار شد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

ΔΔCT با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\Delta\Delta CT=(CT_{treated}-CT_{control})_{targeted\ gene}-(CT_{treated}-CT_{control})_{GAPDH}$$

CT (Threshold Cycle): تلاقی بین منحنی تکثیر و خط آستانه؛

Treated: گروه تیمارشده با دارو؛

Control: گروه تیمارنشده با دارو.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای Reverse و Forward ژن‌ها

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	5′- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3′	5′- GAAGATGGTGATGGGATTTC -3′
TNFα	5′- GCTGCACTTTGGAGTGATCGG -3′	5′- TGGGCTACAGGCTTGTCACT -3′
IL-6	5′- AGCCAGAGCTGTGCAGATGA -3′	5′- CTGCAGCCACTGGTTCTGTG -3′
hTERT	5′- ATGCGACAGTTCGTGGCTCA -3′	5′- ATCCCCTGGCACTGGACGTA -3′

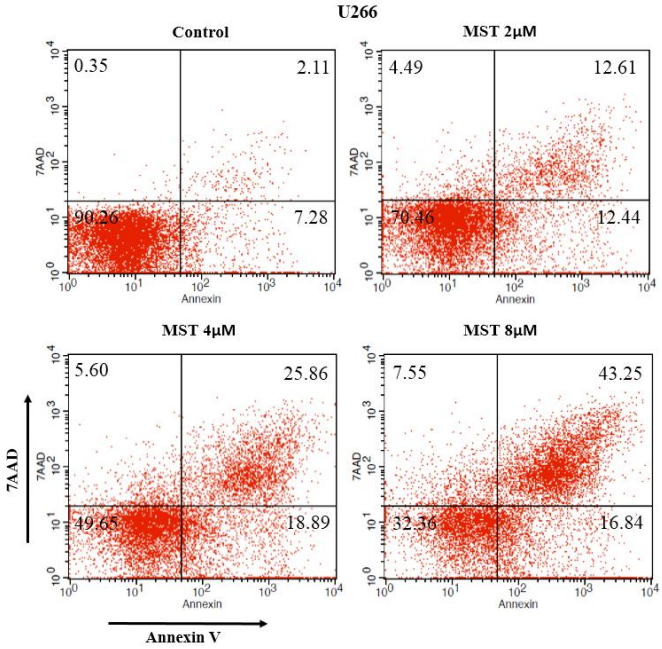
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون Two-tailed Student's t test تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

القای آپوپتوز سلول‌های میلومی U266 به‌وسیله داروی MST-312 صورت گرفت. به‌منظور تعیین تأثیر MST-312 روی آپوپتوز سلولی، سلول‌های میلومی به‌وسیله کیت PE آنکسین-V (شناسایی‌کننده آپوپتوز) آنالیز شدند.

سلول‌های Annexin منفی/ 7-AAD منفی به‌عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شدند. سلول‌های Annexin مثبت/ 7-AAD منفی در مرحله اولیه آپوپتوز قرار داشتند.

سلول‌های Annexin مثبت/ 7-AAD مثبت در مراحل انتهایی آپوپتوز بوده و سلول‌های Annexin منفی/ 7-AAD مثبت نکروتیک تلقی شدند. انکوباسیون کوتاه‌مدت سلول‌های میلومی با MST-312 به‌طور مشخص، سلول‌های آنکسین-V مثبت/ 7AAD منفی و آنکسین-V مثبت/ 7AAD مثبت را افزایش داد که نشان‌دهنده تأثیر آپوپتوتیک MST-312 روی سلول‌های میلومی بود. همچنین تأثیر آپوپتوزی، وابسته به دوز بوده و تقریباً ۳۰٪ افزایش آپوپتوز در سلول‌های U266 بعد از مواجهه کوتاه‌مدت (۴۸ ساعت) با غلظت ۲ میکرومولار MST-312 دیده شد. این غلظت ۲ میکرومولار که با آپوپتوز قابل‌توجهی همراه است، به‌عنوان غلظت مورد استفاده در بررسی بیان ژن انتخاب گردید (شکل).



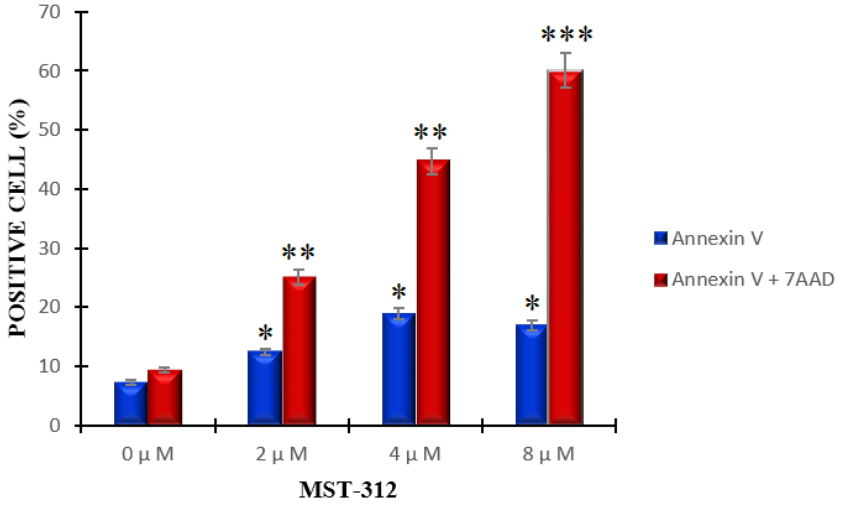
شکل: تأثیر MST-312 روی آپوپتوز سلول‌های U266.

سلول‌های U266 با غلظت‌های مختلف MST-312 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند، سپس اتصال این سلول‌ها به آنکسین-V /7AAD مورد بررسی قرار گرفت. یک آزمایش از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است (p<۰/۰۱ **p<۰/۰۰۱ *p<۰/۰۵).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

کاهش بیان سایتوکاین‌های التهابی IL-6 و TNFα به‌وسیله داروی MST-312 صورت گرفت. ژن‌های IL-6 و TNFα دو ژن مهم در تکثیر، بقا و پاتوژنز مالتیپل‌میلوما بودند.

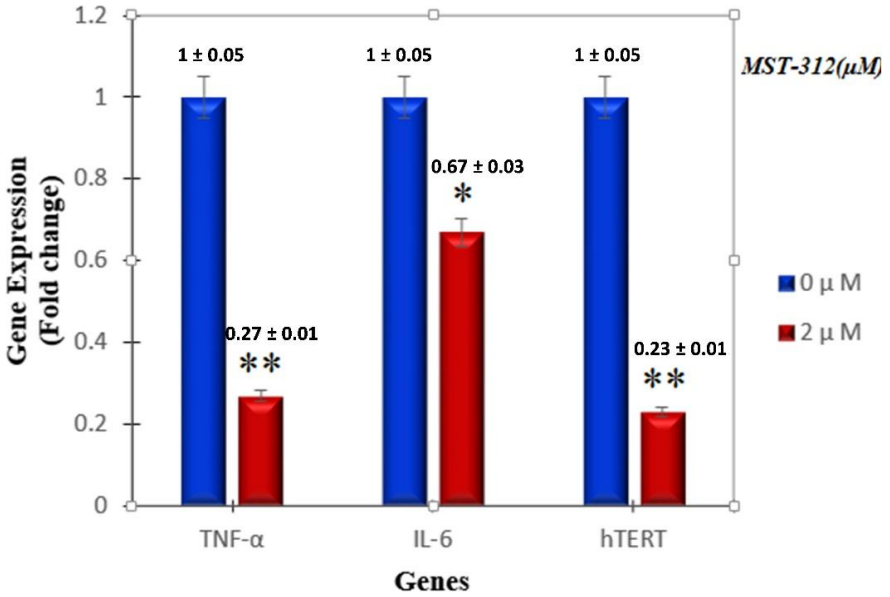
در سلول‌های میلومی تیمارشده با غلظت ۲ میکرومولار در کوتاه‌مدت (۴۸ ساعت)، بیان ژن IL-6 و TNFα کاهش یافت. همچنین بیان ژن TERT نیز در مقایسه با کنترل کاهش، حاکی از کاهش فعالیت تلومرازی بود (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: تأثیر MST-312 روی آپوپتوز سلول‌های U266.

سلول‌های U266 با غلظت‌های مختلف MST-312 به مدت ٤٨ ساعت تیمار شدند، سپس اتصال این سلول‌ها به آنکسین-V /7AAD مورد بررسی قرار گرفت. یک آزمایش از سه مرتبه تکرار نشان داده شده است.

داروی مهارکننده تلومراز MST-312، بیان ژن‌های التهابی IL-6، TNF-α و ژن hTERT را کاهش دادند. پس از تیمار سلول‌های U266 با داروی MST-312 (دوز ۲ میکرومولار در بازه زمانی ۴۸ ساعت)، RNA استخراج و cDNA سنتز شد. نتایج Sybr-green real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داده شده است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: تأثیر MST-312 روی بیان ژن‌های التهابی IL-6، TNF-α و ژن hTERT در سلول‌های U266.

پس از تیمار سلول‌های U266 با داروی MST-312 (دوز ۲ میکرومولار در بازه زمانی ٤٨ ساعت) RNA استخراج و cDNA سنتز شد.

نتایج ybr-green real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داده شده است.

همه مقادیر به‌وسیله بیان ژن GAPDH نرمالیزه شدند. نتایج به‌صورت سه بار تکرار (n=3) و همه مقادیر به‌صورت میانگین±انحراف معیار (Mean±S.D) ارائه شده‌اند (*p<0.05، **p<0.01، در مقایسه با سلول‌های تیمارنشده با MST-312).

بحث

درمان هدفمند (Targeted Therapy)، در سرطان به معنی درمان با عوامل و موادی است که از طریق مداخله با مولکول‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی خاص، مانع رشد و گسترش سرطان می‌شوند. توسعه درمان هدفمند، نیازمند شناخت دقیق اهداف دارویی و مولکول‌های درگیر در پروسه سرطان‌زایی است و در این میان، هدف قرار دادن آن دسته از مولکول‌ها حایز اهمیت و تأثیر بیشتری است که نقش‌های کلیدی را در تومورزایی ایفا می‌کنند (۱۲) مالتیپل‌میلوما نیز مانند سایر سرطان‌ها به‌دلیل درگیری مولکول‌های خاص تومورزا، کاندید درمان هدفمند و توسعه درمانی در این زمینه است. امروزه، با شناخت مسیرهای پیام‌رسانی در مالتیپل‌میلوما و علم به مولکول‌های کلیدی دخیل در پاتوژنز این بیماری، پیشرفت‌هایی حاصل شده است، اما همچنان این بیماری، یک بیماری غیرقابل درمان محسوب شده و لذا یافتن راهکارهای جدید درمانی ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۳). همچنین با توجه به نقش بالای فعالیت تلومراز و ارتباط ذکرشده آن با فاکتور رونویسی NF-κB در مالتیپل‌میلوما به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین مولکول‌های دخیل در بیماریزایی این بدخیمی، دانشمندان راهکارهای مختلفی جهت مهار تلومراز ارائه و آزمایش کرده‌اند؛ چراکه مهار NF-κB ممکن است به سلول‌های نرمال نیز آسیب برساند، اما تلومراز جزء سلول‌های جنسی و بنیادی بوده و فعالیت چندانی در سلول‌های سوماتیک ندارد. لذا هدف قراردادن آن، کمترین آسیب را در برخواهد داشت (۱۴). در تحقیقات پیشین، ترکیبات مختلفی به‌عنوان مهارکننده تلومراز معرفی شده‌اند (۱۵). در این میان، اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG) که کاتچین اصلی چای سبز است، به‌صورت مؤثری تلومراز را مهار می‌کند. مشتقات مختلفی از این ماده (شامل: MST- 312، MST-295 و MST-199) در دسترس است که در این بین، MST-312 به‌طور مؤثرتری تلومراز را مهار می‌کند (۱۶).

مطالعات قبلی در تومورهای مغزی نشان داده‌اند بسته به زمان مواجهه با دارو، MST-312 دارای دو اثر متفاوت است: اثر حاد کوتاه‌مدت که در پی مواجهه کوتاه‌مدت (۷۲ساعت) با MST-312 رخ می‌دهد و منجر به آسیب DNA، توقف چرخه سلولی در G2/M و افزایش مرگ سلولی می‌شود (۱۷). این اثر مستقل از کوتاه‌شدن تلومر بوده و به‌وسیله جداکردن کمپلکس تلومراز از DNA تلومر، سپس شناسایی تلومر به‌عنوان شکست DNA دو رشته‌ای توسط مسیر ATM وساطت می‌گردد و تیمار طولانی‌مدت (بیش از یک‌ماه و نیم) که منجر به کوتاه‌شدن قابل‌توجه طول تلومر می‌شود (۱۸). MST-312 مانند سایر مهارکننده‌های تلومرازی درصورت تیمار کوتاه‌مدت دارای اثرات حادی بوده که مستقل از کوتاه‌شدن طول تلومری است. این اثر حاکی از نقش‌های غیرکانونی تلومراز یا به‌عبارتی مستقل از کاهش طول تلومر است. همچنان‌که مطالعات اخیر نیز به این نقش‌ها اشاره کرده‌اند، ازجمله این فعالیت‌ها می‌توان تنظیم سیکل سلولی، بیان ژن و تنظیم مسیر سیگنالینگ NF-κB توسط تلومراز را نام برد (۱۹،۲۰). در همین راستا، با توجه به اینکه ژن‌های هدف فاکتور رونویسی NF-κB، من‌جمله IL-6 و TNF-α نقش مهمی در رشد و بقای سلول‌های میلومی دارند؛ در مطالعه حاضر برای اولین‌بار اثر این دارو روی رده سلولی میلومی U266 بررسی گردید.

در این مطالعه با توجه به نتیجه تحقیقات فاطمی و همکاران مبنی بر تأثیر داروی MST-312 بر روی تلومراز و اثرات ثانویه آن مانند مهار فاکتور رونویسی NF-κB و قطع ارتباط ذکرشده این دو (۱)؛ رده سلولی U266 به‌عنوان یک رده با توان تولید اتوکراین IL-6، با داروی ضدتلومرازی MST-312 (غلظت ۲ میکرومولار) و زمان ۴۸ ساعت (کوتاه‌مدت)تیمار شد و مشخص گردید این دارو مانع فعالیت‌های تکثیرزایی و بقای سلول‌های میلومی یا به‌عبارتی، کاهش تولید IL-6 و TNFα به‌عنوان کلیدی‌ترین عوامل در بیماریزایی مالتیپل‌میلوما می‌شود. جالب توجه است نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌اند داروی MST-312 هیچ تأثیری بر روی سلول‌های طبیعی منونوکلئار خون محیطی (PBMC) ندارد (۱). این موضوع بیان می‌کند MST-312 تأثیر مهاری انتخابی بر روی رشد سلول‌های میلومی داشته و می‌تواند به‌عنوان کاندیدی

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

مناسب جهت درمان مالتیپل‌میلوما پیشنهاد گردد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر کاهش سایتوکاین‌های التهابی دخیل در پاتوژنز مالتیپل‌میلوما بر روی رده‌های سلولی U266 نشان داده شد با توجه به نتایج، MST-312 را می‌توان به‌عنوان ماده‌ای با اثر مهاری در برابر سلول‌های مالتیپل‌میلوما در نظر گرفت. انجام تحقیقات گسترده‌تر جهت شناخت مکانیسم‌های اثر این دارو ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت درمان و آزمایشگاه پیوند اعضای دانشگاه علوم پزشکی کرمان جهت حمایت‌های علمی و کارمندان مرکز که در اجرای این طرح همکاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018

References:

1. Fatemi A, Safa M, Kazemi A. MST-312 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in APL cells through inhibition of telomerase activity and suppression of NF-κB pathway. Tumour Biol 2015;36(11):8425-37. PubMed
2. Gadó K, Domján G, Hegyesi H, Falus A. Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. Cell Biol Int 2000;24(4):195-209. PubMed
3. Treon SP, Anderson KC. Anderson, Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. Curr Opin Hematol 1998;5(1):42-8. PubMed
4. Mauro C, Zazzeroni F, Papa S, Bubici C, Franzoso G. The NF-κB transcription factor pathway as a therapeutic target in cancer: Methods for detection of NF-κB activity. Methods Mol Biol. 2009;512:169-20. PubMed
5. Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS. Identification of NF-kappaB-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. Oncogene 2003;22(13):2054-64. PubMed
6. Gupta S, Bi R, Kim C, Chiplunkar S, Yel L, Gollapudi S. Role of NF-kappa B signaling pathway in increased tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. Cell Death Differ 2005;12(2):177-83. PubMed
7. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. Oncogene 2001;20(33):4519-27. PubMed
8. Jöhrer K, Janke K, Krugmann J, Fiegl M, Greil R. Transendothelial migration of myeloma cells is increased by tumor necrosis factor (TNF)-α via TNF receptor 2 and autocrine up-regulation of MCP-1. Clin Cancer Res 2004;10(6):1901-10. PubMed
9. Chang JT, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. Eur J Biochem 2002;269(14):3442-50. PubMed
10. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, Khattar E, Shin EM, Yan TD, et al, Telomerase directly regulates NF-κB-dependent transcription. Nat Cell Biol 2012;14(12):1270-81. PubMed
11. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000;88(2):308-16. PubMed
12. Cunningham AP, Love WK, Zhang RW, Andrews LG, Tollefsbol TO. Telomerase inhibition in cancer therapeutics: molecular-based approaches. Curr Med Chem 2006;13(24):2875-88. PubMed
13. Gerber DE. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments Am Fam Physician 2008;77(3):311-9. PubMed
14. Dolloff NG, Talamo G. Targeted therapy in multiple myeloma. Adv Exp Med Biol 2013;779:197-221. PubMed

15. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho P, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994;266(5193):2011-5. PubMed

16. Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. Crit Rev Oncol Hematol 2006;57(3):191-214. PubMed

17. Shay JW, Wright WE. Telomerase: A target for cancer therapeutics, in Gene-Based Therapies. Cancer Cell 2010;2(4):257-65. Link

18. Serrano D, Bleau AM, Fernandez-Garcia I, Fernandez-Marcelo T, Iniesta P, Ortiz-de-Solorzano C, et al. Inhibition of telomerase activity preferentially targets aldehyde dehydrogenase-positive cancer stem-like cells in lung cancer. Mol Cancer 2011;10:96. PubMed

19. Gellert GC, Dikmen ZG, Wright WE, Gryaznov S, Shay JW. Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2006;96(1):73-81. PubMed

20. Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, Kotzsch M, Schwenzer B, Wirth MP, et al. Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. Clin Cancer Res 2003;9(10 Pt 1):3794-800. PubMed

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 16:12 IRDT on Monday June 25th 2018