

Inhibition of survivin and its anti-apoptotic splice variant sur- Δ Ex3 genes expression followed by apoptosis through carbenoxolone in K562 cells

Moosavi MA^{1*}, Moasses Ghafary S¹, Asadi M², Asvadi Kermani F³

1-Department of Zoology, Tabriz University, Tabriz, Iran

2-Department of Pharmacology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3-Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received 30 Aug 2010 , Accepted 27 Oct 2010

Abstract

Background: Leukemia is a malignant and progressive disease. Over-expression of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), such as survivin and its anti-apoptotic variants, including sur- Δ Ex3, is the main cause of resistance to apoptotic effects of chemotherapy drugs. In the present study, the effects of CBX on apoptosis and expression level of survivin and sur- Δ Ex3 and K562 cells (experimental model of chronic myeloid leukemia) were investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, human K562 cells were cultured and exposed to CBX. Trypan blue exclusion test was used to evaluate growth inhibitory and viability effects of the drug. Fluorescent microscopy (acridine orange/ ethidium bromide double staining) and DNA electrophoresis were applied to the study of apoptosis. The expression level of survivin and sur- Δ Ex3 was studied by semiquantitative RT-PCR.

Results: The results showed that after the 48 h treatment of K562 cells with 150 μ M CBX, significant growth inhibitory and apoptotic effects (up to 50%) were induced. In addition, after 2-4 h of treatment with CBX (150 μ M), down-regulation of survivin and sur- Δ Ex3 were observed. However, the expression level of survivin and sur- Δ Ex3 increased to the level of control cells with longer treatment times (6-12 h).

Conclusion: Noticing the apoptotic and down-regulatory effects of CBX on survivin and sur- Δ Ex3 expression, this drug can be used as a potential candidate for further studies on CML treatment, especially for inhibition of drug resistance in leukemia cells.

Keywords: Apoptosis, Carbenoxolone, Drug Resistance, K562, Leukemia, Survivin

*Corresponding author:

Address: Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology, Tabriz University, Tabriz, Iran

Email: moosav_m@tabrizu.ac.ir

مهار بیان ژن survivin و واریانت آنتی آپوپتوتیک $\Delta Ex3$ -sur به همراه القاء آپوپتوز توسط کاربنوکسولون در سلول های K562

محمد امین موسوی¹، سروش مؤسس غفاری²، مسعود اسدی³، ایرج اسودی کرمانی⁴

1- استادیار، دکترای بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

2- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

3- استادیار، دکترای فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

4- استاد، گروه هماتولوژی و انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: 89/ 6/ 8، تاریخ پذیرش: 89/ 8/ 5

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی یک بیماری بدخیم و پیشرونده است. بیان بالای پروتئین های مهار کننده آپوپتوز (IAPs) نظیر survivin و واریانت های ضد آپوپتوزی آن مانند $\Delta Ex3$ -sur سبب بروز مقاومت به اثرات آپوپتوزی داروهای شیمی درمانی می گردد. در مطالعه حاضر اثرات کاربنوکسولون بر رده سلولی K562 (مدل آزمایشگاهی لوسمی میلوئید مزمن) و نیز بیان ژن survivin و $\Delta Ex3$ -sur بررسی شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، رده سلولی K562 انسانی پس از کشت، تحت تاثیر CBX قرار گرفت. به منظور بررسی درصد مهار رشد و زیستایی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو و برای بررسی آپوپتوز از میکروسکوپ فلورسانس (رنگ آمیزی با محلول آکریدین اورنج-تیدیوم بروماید) و تکنیک الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز استفاده شد. بیان ژن survivin با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرازی رونویسی معکوس نیمه کمی ارزیابی گردید.

یافته ها: غلظت 150 میکرومولار از CBX پس از 48 ساعت باعث مهار رشد و القاء آپوپتوز (تا 50 درصد) در سلول های K562 گردید. به علاوه، این ترکیب سبب کاهش بیان ژن survivin و واریانت پیرایشی ضد آپوپتوزی $\Delta Ex3$ -sur پس از 2 و 4 ساعت در این سلول ها شده، در حالی که با افزایش زمان تیمار (6 و 12 ساعت) و با وقوع فرآیند آپوپتوز بیان این ژن ها تا سطح بیان آن ها در سلول های کنترل افزایش یافت.

نتیجه گیری: با توجه به اثر CBX در القاء آپوپتوز و نیز کاهش بیان ژن survivin و $\Delta Ex3$ -sur، این دارو می تواند به عنوان کاندیدای بالقوه برای مطالعات بیشتر به عنوان دارویی در درمان لوسمی میلوئیدی مزمن و کاهش مقاومت دارویی مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، کاربنوکسولون، مقاومت دارویی، K562، لوسمی، Survivin

*نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه زیست شناسی جانوری

Email: moosav_m@tabrizu.ac.ir

مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic myeloid leukemia-CML) یکی از شناخته شده ترین انواع لوسمی است که به دلیل جابه جایی دو طرفه بین ژن *abl* بر روی کروموزوم 9 و ژن *bcr* بر روی کروموزوم 22 در سلول های بنیادی خونی ایجاد می شود. انکوژن *Bcr-Abl* حاصل از این جابه جایی، پروتئین $p210^{Bcr-Abl}$ را کد می کند که علاوه بر تکثیر بی رویه سلول های پیش ساز میلوئید باعث اختلال در مرگ برنامه ریزی شده آپوپتوز نیز می گردد (۲،۱). از جمله راه کارهای درمانی که تا کنون برای درمان CML به کار گرفته شده، می توان به شیمی درمانی، پیوند مغز استخوان، درمان با اینترفرون آلفا و درمان های ترکیبی اشاره کرد (3). اخیراً داروئی به نام ایماتینیب مسیلات (*Imatinib mesylate*) یا *STI571* و نسل های بعدی آن هم به کار گرفته شده اند، ولی وجود مقاومت دارویی مانع اصلی در بهبود این بیماران با روش های درمانی فوق شده است (4). از دلایل اصلی مقاومت دارویی سلول های سرطانی در برابر شیمی درمانی، مقاومت به آپوپتوز القاء شده توسط داروهای شیمی درمانی است که عمدتاً به علت بیان بالای پروتئین های مهار کننده آپوپتوز (- *Inhibitors of Apoptosis*) رخ می دهد (5، 6). *Survivin* عضو جدید خانواده پروتئین های مهار کننده آپوپتوز به شمار می رود که نقش مهمی در تنظیم مرگ سلولی و کنترل تقسیم سلولی ایفا می کند (7). مطالعات صورت گرفته نشان داده اند که *survivin* به میزان بالایی در مبتلایان به CML در مقایسه با افراد سالم بیان شده و با یک عامل پیش آگهی نامطلوب همراه است (8). از این رو تلاش های اخیر در زمینه استفاده از داروهایی که علاوه بر القاء آپوپتوز، باعث کاهش بیان *Survivin* و واریانت های پیرایشی آن شوند، متمرکز شده است (۹، ۱۰). یکی از این واریانت ها *sur-ΔEx3* می باشد که دارای نقش آنٹی آپوپتوزی بوده و افزایش بیان آن در چندین تومور انسانی از قبیل لوسمی میلوئیدی حاد، لوسمی لمفوئیدی حاد و

مزمن، لمفوما، مدولوبلاستوما، کارسینوما کلیه و معده گزارش شده است (11-15). در این میان داروی کاربنوکسولون (*Carbenoxolone-CBX*) با دارا بودن ساختاری شبه گلوکوکورتیکوئیدی می تواند به عنوان یک عامل القاء کننده آپوپتوز حائز اهمیت باشد (شکل 1). *CBX* یک داروی نیمه سنتتیک مشتق شده از ترکیب طبیعی گلیسیرتینیک اسید (*Glycyrrhetic Acid -GE*) می باشد. *CBX* با فرمول مولکولی $C_{34}H_{50}O_7$ برای اولین بار در سال 1959 سنتز و در سال 1960 به دلیل شباهت ساختاری که با استروئیدها داشت، به عنوان یک عامل ضد التهاب معرفی گردید. سپس این ترکیب به عنوان اولین ترکیب درمانی فعال در درمان زخم معده و دهان شناخته شد (16-19). اخیراً خواص ضد سرطانی قابل توجهی از *CBX* در برخی سرطان ها شامل سرطان سینه، ریه و چند سرطان دیگر گزارش شده است و تاکنون مطالعه ای در مورد CML صورت نگرفته است (۲۰، ۲۱). *CBX* قادر به القاء استرس اکسیداتیو از طریق ایجاد نفوذپذیری گذرای میتوکندری (*Mitochondrial permeability transition-MPT*) و در نتیجه آزاد سازی سیتوکروم C بوده، از این رو می تواند به عنوان یک عامل تحریک کننده آپوپتوز به شمار آید (22). به هر حال هنوز مطالعه ای در مورد اثرات احتمالی *CBX* در القاء آپوپتوز و مکانیسم آن در بیماران مبتلا به CML صورت نگرفته است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات القاء آپوپتوزی *CBX* در ارتباط با مهار بیان ژن *survivin* و واریانت پیرایشی ضد آپوپتوزی *sur-ΔEx3* در رده سلولی K562 به عنوان مدل مناسبی برای فاز بلاست CML صورت پذیرفت. K562 سلول بنیادی سرطانی بوده که علاوه بر جهش در p53 و بیان بالای گلیکو پروتئین p، بیان بالای انواع مهارکننده های آپوپتوز از جمله *survivin* را نشان می دهد (۲۳، ۲۴).

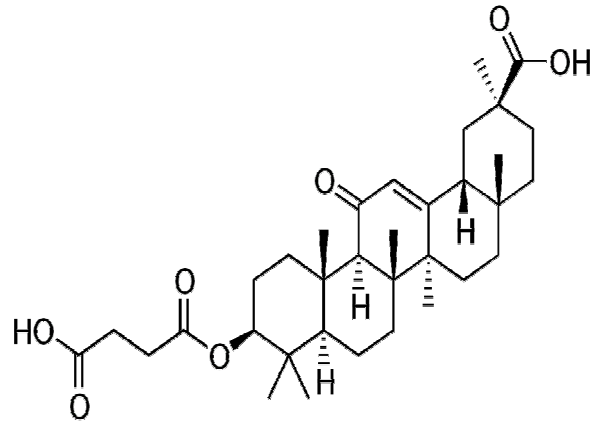
داده شد. پس از تهیه گستره، تغییرات مورفولوژیکی سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده گردید. برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید، بدین منظور تعداد 5×10^5 سلول با غلظت 150 میکرومولار از CBX تیمار شد. پس از سانتیفریژ، سلول ها با 20 میکرولیتر بافر لیز کننده EDTA, SDS 0.8 % [W/V], RNase A/T1 (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, 100 mM) (Merck-آلمان) لیز و سپس 10 میکرولیتر RNase A/T1 و پروتئیناز K هر کدام به طور جداگانه افزوده شد و در دمای 50 درجه سانتی گراد برای حداقل 90 دقیقه قرار گرفت. پس از افزودن 5 میکرولیتر بافر لودینگ (30 درصد گلیسرول و 25 درصد بروموفنول بلو)، هر یک از نمونه های موجود در چاهک های ژل آگارز 1/5 درصدی بار گذاری شد. با انجام الکتروفورز قطعات DNA از هم جدا شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به منظور بررسی اثرات CBX در بیان ژن survivin مراحل ذیل به ترتیب انجام شد.

استخراج RNA

سلول های گروه کنترل و سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف CBX پس از 2، 4، 6، 8 و 12 ساعت برداشت شده و مقادیر یکسان از هر گروه سلول ها پس از شستشو جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. RNA کل با استفاده از محلول RNX-Plus و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن - ایران) استخراج شد. به دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلودگی با RNase جهت غیر فعال سازی این آنزیم کلیه لوازم مورد استفاده با محلول دی اتیل پیرو کربنات 0/1 درصد (Di Ethyl pyro carbanate-DEPC) تیمار گردید. کمیت و کیفیت RNA به دست آمده با روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

تیمار با DNaseI و واکنش رونویسی معکوس (RT)

به منظور جلوگیری از آلودگی RNA حاصله با DNA، ابتدا مقادیر یکسان از RNA اولیه (1 میکروگرم)



شکل 1. ساختار مولکولی کاربنوکسولون

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، رده سلولی K562 از بانک سلولی ایران خریداری شد. سلول ها در محیط کشت RPMI دارای 10 درصد سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین (100 میکروگرم بر میلی لیتر) و بنی سیلین (100U/ml) (سیناژن - ایران) در انکوباتور با شرایط 5 درصد CO_2 ، دمای 37 درجه سانتی گراد و رطوبت 95 درصد کشت داده شد و پس از 48 ساعت محیط کشت تعویض می شد. برای انجام آزمایشات، پاساژ چهارم یا پنجم سلول ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی به کار گرفته شد و برای بررسی رشد و زیستایی سلولی از آزمون دفع رنگ تریپان بلو استفاده شد. بدین منظور، غلظت های 50 تا 300 میکرومولار از CBX (Sigma-آمریکا) در فواصل زمانی 12، 24 و 48 ساعت به هر چاهک پلیت نود شش تایی حاوی 2×10^4 سلول افزوده و سپس تعداد سلول های هر چاهک با استفاده از شمارش گر سلولی و رنگ تریپان بلو (Sigma-آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت (25). جهت بررسی تغییرات ریخت شناسی آپپتوز 25 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (5×10^5) با 1 میکرولیتر از محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (Sigma-آمریکا) با نسبت حجمی 1:1 مخلوط و 10 میکرولیتر از آن بر روی لام میکروسکوپی قرار

واکنش PCR برای ژن survivin در دو مرحله و با استفاده از پرایمرهای داخلی و خارجی صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده قادر به تکثیر واریانت sur-ΔEx3 نیز می‌باشند. از ژن β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش PCR برای هر دو ژن β2m و survivin در تیوب‌های جداگانه و در شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلودگی، یک تیوب نیز به عنوان کنترل منفی در هر واکنش به کار رفت که در آن به جای cDNA آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. بعد از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از تکثیر بهینه قطعه مورد نظر، محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز 1/5 درصد بررسی گردید.

مربوط به هر گروه از سلول‌ها با آنزیم DNaseI تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT (Fermentase - آلمان) و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RT (Fermentase - آلمان) به cDNA تبدیل شدند.

طراحی پرایمر و واکنش PCR

در این مطالعه از ژن بتا 2 میکروگلوبولین (Beta2-microglobulin-β2M) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و برای تکثیر آن از پرایمرهایی که توسط بابایی و همکاران طراحی شده بود استفاده گردید (26). توالی و مشخصات این پرایمرها در جدول 1 آورده شده است.

جدول 1. توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن β2m و survivin

β2m (NM_00114048) size of product: 191 bp
HBF (Human β2m Forward primer): 5'-CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3' (94-114)
HBR (Human β2m Reverse primer): 5'-GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3' (284-265)
Survivin (NM_001168) size of products: Survivin: 556 bp, Survivin-ΔEx3: 438 bp
HFP (Human Survivin Forward Primer): 5'-TGG CAG CCC TTT CTC AAG-3' (149-166)
HRP (Human Survivin Reverse Primer): 5'-GAG AGA GAG AAG CAG CCA C-3' (782-762)
HFPN (Human Forward Primer Nested): 5'-ACC ACC GCA TCT CTA CAT TC-3' (168-187)
HRPN (Human Reverse Primer Nested): 5'-CTG GTG CCA CTT TCA AGA C-3' (723-705)

یافته ها

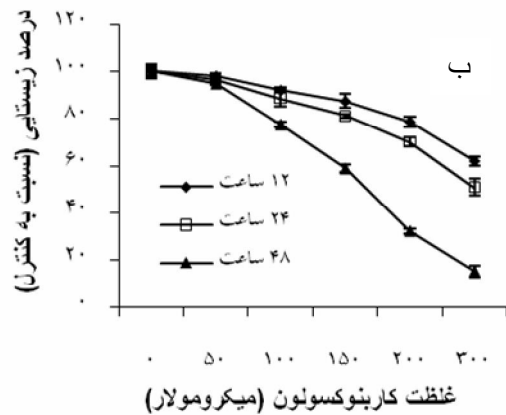
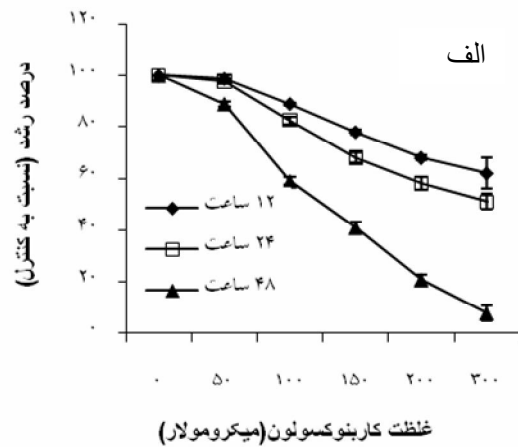
CBX سبب مهار رشد سلولی و زیستایی در سلول های K562 می‌گردد. در شکل 1 ساختار CBX مشاهده می‌شود. برای بررسی اولیه اثرات این ترکیب بر رشد و تکثیر سلول‌ها از آزمون تریپان بلو استفاده گردید. همان‌طور که در نمودار 1 نشان داده شده، CBX سبب مهار رشد سلول‌های K562 در غلظت‌های متفاوت 50 تا 300 میکرومولار پس از زمان‌های 12، 24 و 48 ساعت می‌شود. در غلظت 300 میکرومولار میزان مهار رشد نسبت به کنترل در زمان‌های 12، 24 و 48 ساعت به ترتیب 38، 49، 92 درصد بود. همچنین در 48 ساعت میزان مهار رشد نسبت به کنترل در غلظت‌های 100، 150، 200 و 300 میکرومولار به ترتیب 11، 41، 59، 79 و 92 درصد بود (نمودار 1-الف). میزان زیستایی این سلول‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار 1-ب). در غلظت 300

به منظور تعیین هویت قطعات حاصل از PCR، باندهای مربوط به survivin (556 نوکلئوتیدی) و واریانت پیرایشی sur-ΔEx3 (438 نوکلئوتیدی) پس از استخراج از ژل، توسط شرکت (Microgene) میکروژن تعیین توالی و با توالی موجود در بانک ژنی مقایسه گردید. به منظور کمی‌سازی بیان ژن، تصاویر مربوط به الکتروفورز ژل آگارز توسط نرم‌افزار Uvidoc مورد بررسی قرار گرفت و پس از تعیین حجم باندها، شاخص بیان ژن در هر نمونه (نسبت حجم باند مذکور به حجم باند β2m) محاسبه شد. تمامی داده‌های به دست آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار از سه آزمایش مستقل بوده است. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 14 و آزمون آماری تی مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده‌های با ارزش $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند.

شده در نمودار 1، IC_{50} (غلظتی از دارو که باعث مهار 50 درصدی سلول ها می شود)، 150 میکرومولار تعیین شد. همچنین سبب القاء آپوپتوز در سلول های K562 می گردد. به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط CBX از میکروسکوپ فلورسانس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. همان طور که در شکل 2 مشاهده می گردد، سلول های K562 تیمار شده با CBX (150 میکرومولار) پس از 48 ساعت در مقایسه با سلول های کنترل، دارای کروماتین بسیار فشرده یا قطعه قطعه به رنگ سبز یا نارنجی درخشان می باشند که حاکی از القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این سلول ها توسط CBX می باشد. لازم به ذکر است که وقوع آپوپتوز از زمان 6 ساعت پس از تیمار با CBX آغاز گردیده است. به منظور بررسی بیشتر آپوپتوز، از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. با توجه به شکل 3، مشاهده لکه (Smear) در سلول های تیمار شده با CBX بر روی ژل آگارز و عدم مشاهده آن در سلول های کنترل، نشان دهنده قطعه قطعه شدن DNA به عنوان یکی دیگر از شاخص های وقوع مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول های K562 می باشد. لازم به ذکر است که قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562 در طی آپوپتوز حالت نردبانی متداول را نشان نمی دهد (27). همچنین مشاهده شد که CBX باعث کاهش بیان ژن survivin و واریانت پیرایشی $sur-\Delta Ex3$ در سلول های K562 می گردد.

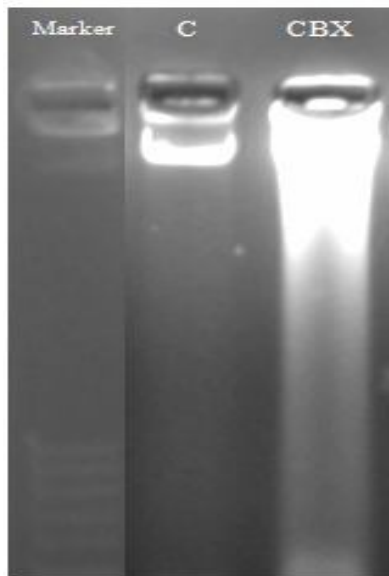
به منظور بررسی اثرات CBX بر مقاومت دارویی، بیان ژن survivin و واریانت پیرایشی $sur-\Delta Ex3$ ، به عنوان تنظیم کننده های مهم در وقوع آپوپتوز، مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور سلول های K562 با غلظت 150 میکرومولار CBX برای زمان های 2، 4، 6 و 12 ساعت (یعنی از قبل از وقوع آپوپتوز تا هنگام رخداد آپوپتوز) تیمار گردیدند (شکل 4).

میکرومولار میزان زیستایی نسبت به کنترل در زمان های 12، 24 و 48 ساعت به ترتیب 38، 49 و 85 درصد کاهش می یابد.

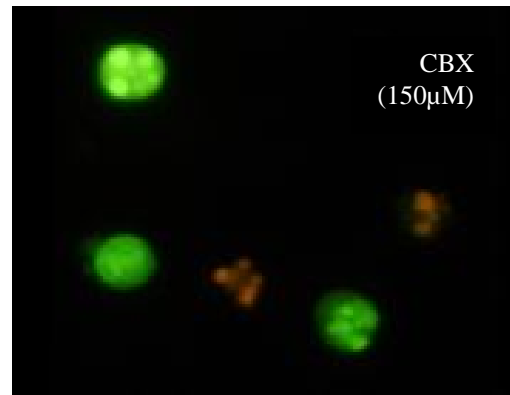
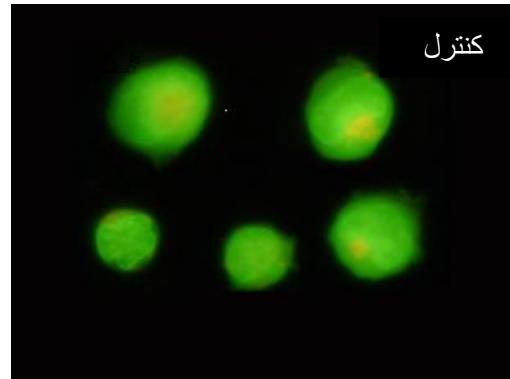


نمودار 1. اثرات CBX بر رشد و زیستایی سلول های K562. پس از تیمار سلول ها با غلظت های متفاوتی از CBX (50-300 میکرومولار) و در فواصل زمانی مختلف (12-48 ساعت) درصد مهار رشد (الف) و زیستایی سلول ها (ب) با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مطابق مواد و روش ها مورد بررسی قرار گرفت. تمامی داده های نمایش داده شده نسبت به کنترل از نظر آماری معنادار ($P < 0/05$) می باشند.

همچنین در 48 ساعت میزان زیستایی نسبت به کنترل در غلظت های 50، 100، 150، 200 و 300 میکرومولار به ترتیب 5، 22، 41، 67 و 85 درصد کاهش می یابد. این نتایج نشان دهنده این است که CBX علاوه بر مهار رشد سلولی در سلول های K562، باعث کاهش زیستایی سلولی نیز می گردد و این اثرات CBX به صورت معنی داری ($p < /05$)، وابسته به زمان و غلظت تغییر می یابد. بر اساس داده های ارائه



شکل 3. بررسی اثرات آپوپتوزی CBX بر قطعه قطعه شدن DNA در سلول های K562. پس از تیمار سلول ها با 150 میکرومولار از CBX به مدت 48 ساعت با استفاده از الکتروفورز DNA به کمک ژل آگارز، اثرات آپوپتوزی CBX بررسی شد.



شکل 2. اثر CBX بر تغییرات ریخت شناسی آپوپتوز سلول های K562. پس از تیمار سلول ها با 150 میکرومولار CBX به مدت 48 ساعت خصوصیات ظاهری آپوپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و رنگ آمیزی با آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. (الف) تصویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول های K562 در محیط کشت RPMI بدون افزودن دارو (ب) تصویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول های K562 پس از افزودن دارو به محیط را نشان می دهد. وجود سلول های نارنجی یا سبز با هسته های متراکم حاکی از وقوع آپوپتوز می باشد.

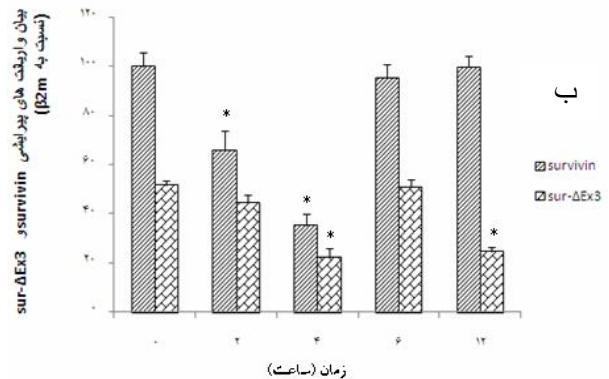
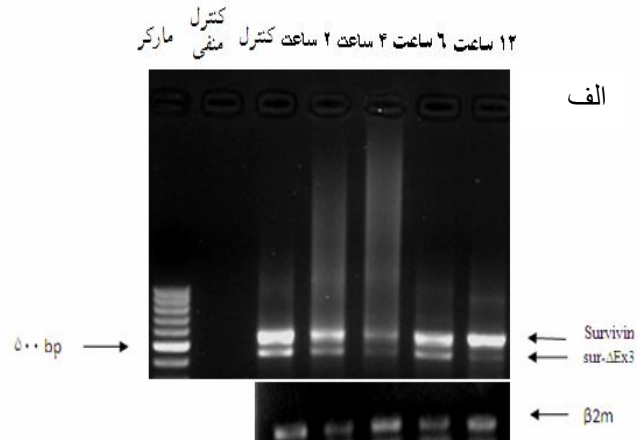
بحث

در حال حاضر دارو هایی که برای درمان CML به کار می روند، اغلب به دلیل ایجاد مقاومت دارویی و افزایش بیان survivin و دیگر مهار کننده های آپوپتوز باعث عدم القاء آپوپتوز و در نهایت مرگ بیمار می شوند. از این رو مطالعات وسیعی برای یافتن داروهای جدید با توانائی القاء آپوپتوزی قوی و در عین حال کاهش دهنده بیان ژن های مقاومت به آپوپتوز در جریان است (28). در مطالعه حاضر ما برای اولین بار نشان دادیم که داروی CBX قادر به القاء آپوپتوز و همچنین مهار بیان ژن های survivin و واریانت ضد آپوپتوزی آن، $sur-\Delta Ex3$ ، در سلول های K562 می باشد. داده های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که CBX در محدوده غلظتی 50 تا 300 میکرومولار و در مدت زمان 12 ساعت باعث مهار رشد و کاهش زیستایی در سلول های K562 می شود. بر اساس این داده ها، IC_{50} حدود 150 میکرومولار تعیین (نمودار 1) و برای مطالعه آپوپتوز و

بررسی نیمه کمی ارتباط فرآیند آپوپتوز با بیان ژن survivin در محدوده زمانی مورد مطالعه حاکی از کاهش بیان ژن survivin در سلول های K562 پس از 2 و 4 ساعت تیمار با CBX می باشد، در حالی که با افزایش زمان تیمار (6 و 12 ساعت) بیان survivin به تدریج افزایش یافته و تقریباً به سطح بیان این ژن در سلول های کنترل می رسد. لازم به ذکر است که بیان واریانت پیرایشی $sur-\Delta Ex$ نیز همانند survivin تا 4 ساعت پس از تیمار با CBX کاهش یافته اما پس از آن الگوی بیانی مشخصی نشان نمی دهد (شکل 4).

هیدرولیز به گلیسریتینیک اسید (GE) سبب القاء آپپتوز در تیموسیت ها و اسپلنوسیت های موشی گردد به طوری که در شرایط *In vivo*، 2/5 میلی گرم از GE پس از 24 ساعت تیمار منجر به القاء آپپتوز در تیموسیت های موشی می گردد (۲۹، ۳۰). به علاوه مطالعات دیگر نشان داده اند که CBX قادر به القاء آپپتوز از طریق ایجاد نفوذ پذیری گذرای میتوکندری کبد رت (در محدوده غلظتی 20-300 میکرومولار) و همچنین در ناحیه ی بازال جفت رت می باشد (۳۱، ۳۲). در توافق با این گزارشات، نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که CBX در محدوده غلظتی مشابه گزارشات موجود و پس از 24 ساعت، منجر به قطعه قطعه شدن DNA و تغییرات ریخت شناسی مشابه آپپتوز در سلول های K562 می گردد. لازم به ذکر است که در الکتروفورز DNA در سلول های K562 تیمار شده با CBX به جای حالت نردبانی (Ladder)، حالت لکه (Smear) مشاهده شد که می تواند به دلیل نقص در عملکرد آنزیم Caspase activated DNA نقش اصلی را در برش بین نوکلئوزومی DNA در طول آپپتوز به عهده دارد، باشد (33). با توجه به این که آپپتوز یک مکانیسم دفاعی سلول در برابر سرطانی شدن بوده و اختلال در آن به عنوان یک عامل مهم در ایجاد و گسترش سرطان به شمار می آید، اثر القاء آپپتوزی CBX در این رده سلولی حائز اهمیت می باشد. به علاوه در مطالعه حاضر نشان داده شد که CBX (150 میکرومولار) قادر به کاهش بیان survivin و $\Delta Ex3$ در سلول های K562 تیمار شده پس از 2 و 4 ساعت بوده، در حالی که پس از آن با افزایش زمان تیمار (6 و 12 ساعت) و با وقوع فرآیند آپپتوز، بیان این ژن ها به تدریج افزایش یافت. به طور مشابه در مطالعات صورت گرفته بر روی سلول های HL-60 تیمار شده با داروهای daunorubicin و Mitoxantrone، نشان داده شده که سطح بیان survivin mRNA پس از 24 ساعت تیمار کاهش یافته، در حالی که با افزایش زمان تیمار (72 ساعت) و با وقوع

بررسی بیان ژن survivin از این غلظت استفاده گردید. در محدوده نزدیک به غلظت های مطالعه ما اثرات مهار رشدی CBX در سرطان های دیگر نیز به اثبات رسیده است. به عنوان مثال در مطالعه صورت گرفته بر روی سلول های HeLa انسانی نشان داده شده که غلظت 400 میکرومولار و غلظت های بالاتر از CBX پس از 16 ساعت منجر به مهار رشد و کاهش زیستایی در این سلول ها می شود (23).



شکل 4. اثرات CBX بر بیان ژن Survivin و واریانت پیرایشی sur- $\Delta Ex3$ پس از تیمار سلول های K562 با 150 میکرومولار CBX در زمان های مختلف (2-12 ساعت)، بیان ژن Survivin و واریانت پیرایشی sur- $\Delta Ex3$ با استفاده از تکنیک RT-PCR (الف) بررسی و با کمک نرم افزار uvidoc (ب) کمی شدند. از $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. مقادیر نشان داده شده با علامت * از نظر آماری نسبت به کنترل خود معنادار ($P < 0/05$) می باشند.

همچنین اثرات آپپتوزی CBX در چندین مورد گزارش شده است. به عنوان مثال CBX قادر است از طریق

منفذ دار (Gap junction) تایید کرده است (38). این که مکانیسم اصلی اثر CBX در سلول های K562 چه می باشد، نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

نتیجه گیری

به طور کلی با توجه به عملکرد مؤثر CBX در القاء آپوپتوز و مهار رشد در سلول های K562 این ترکیب می تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه در درمان CML مطرح گردد و به خصوص با توجه به اثر آن در کاهش بیان survivin و واریانت ضد آپوپتوزی $sur-\Delta Ex3$ در زمان های اولیه پس از تیمار، CBX می تواند به عنوان یک ترکیب مؤثر در کاهش مقاومت دارویی سلول های لوسمیگ مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست محترم بیمارستان شهید قاضی و معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز که حمایت مالی انجام این تحقیق را به عهده داشته اند، ابراز می دارند.

منابع

1. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-56.
2. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood*. 1996;88(9):3522-7.
3. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(7):973-88.
4. Valent P. Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML): Current concepts on pathogenesis and new emerging pharmacologic approaches. *Biologics*. 2007;1(4):433-48.

فرآیند آپوپتوز به تدریج افزایش می یابد (34). به نظر می رسد که شروع مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول های K562 در 6 ساعت پس از تیمار با دارو آغاز می شود، در زمان های اولیه پس از تیمار، CBX این سلول ها را از طریق کاهش بیان survivin و $sur-\Delta Ex3$ نسبت به وقوع آپوپتوز حساس می کند، در حالی که با افزایش زمان تیمار و با رخداد آپوپتوز، سطح بیان این ژن ها افزایش و تقریباً به سطح بیان آنها در سلول های کنترل می رسد. لازم به ذکر است که تاکنون اثرات CBX بر بیان survivin گزارش نشده است. نتایج اثرات CBX بر بیان survivin از این جنبه اهمیت دارد که امروزه راهکارهای مختلفی برای هدف گیری survivin در سلول های سرطانی تحت بررسی است، به عنوان مثال الیگونوکلوئید آنٹی سنس با کاهش بیان survivin باعث کاهش مقاومت دارویی و القای آپوپتوز در سلول های سرطانی از قبیل K562 شده است (35). چندین مکانیسم در ارتباط با نحوه اثر القای آپوپتوزی CBX مطرح است. مطالعات وسیعی بر روی CBX صورت گرفته که بیانگر ایجاد نفوذ پذیری گذرای میتوکندری در نتیجه القاء استرس اکسیداتیو توسط این دارو می باشد که می تواند منجر به راه اندازی مسیر داخل سلولی آپوپتوز گردد (22). CBX با دارا بودن ساختاری شبه گلوکوکورتیکوئیدی قادر به میان کنش با گیرنده های گلوکوکورتیکوئیدی (GR) و مینرالو کورتیکوئیدی (MR) و در نتیجه القاء آپوپتوز به واسطه اتصال به عامل گیرنده گلوکوکورتیکوئید

(Glucocorticoid Receptor Element-GRE)

می باشد. بیان GR سیتوزولیک در رده ی سلولی K562 نشان داده شده است و لذا این امکان وجود دارد که اثرات القاء آپوپتوزی CBX به واسطه ساختار شبه گلوکوکورتیکوئیدی این دارو و اتصال به GR در رده سلولی K562 و در نتیجه کاهش بیان برخی ژن های درگیر در مسیر های آپوپتوتیک باشد (36، 37). به علاوه مطالعات آزمایشگاهی متفاوت اثر مهاری داروی CBX را در ارتباط بین سلولی از نوع اتصال

5. Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2024-34.
6. McConkey DJ, Greene G, Pettaway CA. Apoptosis resistance increases with metastatic potential in cells of the human LNCaP prostate carcinoma line. *Cancer Res.* 1996;56(24):5594-9.
7. Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(8):5053-60.
8. Conte E, Stagno F, Guglielmo P, Scuto A, Consoli C, Messina A. Survivin expression in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2005;225(1):105-10.
9. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 2005;92(2):212-6.
10. Wang TT, Qian XP, Liu BR. Survivin: potential role in diagnosis, prognosis and targeted therapy of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2007;13(20):2784-90.
11. Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, et al. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2004;28(5):487-94.
12. Fangusaro JR, Jiang Y, Holloway MP, Caldas H, Singh V, Boué DR, et al. Survivin, Survivin-2B, and Survivin-deItaEx3 expression in medulloblastoma: biologic markers of tumour morphology and clinical outcome. *Br J Cancer.* 2005;92(2):359-65.
13. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marcé S, Villamor N, et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol.* 2004;164(2):501-10.
14. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, et al. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2002;100(1):30-6.
15. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Müller W, Takeno S, et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer.* 2002;86(5):737-43.
16. Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* 2006;8(2):E239-53.
17. Khorasani MZ, Hosseinzadeh SA, Vakili A. Effect of central microinjection of carbenoxolone in an experimental model of focal cerebral ischemia. *Pak J Pharm Sci.* 2009;22(4):349-54.
18. Isbrucker RA, Burdock GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006;46(3):167-92.
19. Hausmann W, Tárnoky AL. Biochemical effects of short-term treatment with carbenoxolone disodium. *Br J Pharmacol Chemother.* 1966;26(2):412-20.
20. Hundertmark S, Bühler H, Rudolf M, Weitzel HK, Ragosch V. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells. *J Endocrinol.* 1997;155(1):171-80.
21. Trovato-Salinaro A, Trovato-Salinaro E, Failla M, Mastruzzo C, Tomaselli V, Gili E, et al. Altered intercellular communication in lung fibroblast cultures from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2006;7:122.
22. Salvi M, Fiore C, Battaglia V, Palermo M, Armanini D, Toninello A. Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening. *Endocrinology.* 2005;146(5):2306-12.
23. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 1977;19(1):136.
24. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrell RE. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res.* 1993;17(12):1045-50.
25. Ahmadi AH, Moosavi SMA, Hosseinpour Feizi M. [The inductive effect of boric acid on

- growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line]. Arak University of Medical Sciences Journal. 2010;13(3):1-11.
26. Babaei E, Mowla SJ, Shariat Torbaghan S, Emadi Bayegi M. Detection of survivin gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of human osteosarcoma: its potential usefulness in diagnosis and prognosis of bone tumors. Iran Biomed J. 2006;10:39-45.
27. Moosavi MA, Yazdanparast R, Lotfi A. GTP induces S-phase cell-cycle arrest and inhibits DNA synthesis in K562 cells but not in normal human peripheral lymphocytes. J Biochem Mol Biol. 2006;39(5):492-501.
28. Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly imatinib mesylate-resistant bcr/abl+ human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. Mol Pharmacol. 2007;72(3):788-95.
29. Chintharlapalli S, Papineni S, Jutooru I, McAlees A, Safe S. Structure-dependent activity of glycyrrhetic acid derivatives as peroxisome proliferator-activated receptor $\{\gamma\}$ agonists in colon cancer cells. Mol Cancer Ther. 2007;6(5):1588-98.
30. Horigome H, Horigome A, Homma M, Hirano T, Oka K. Glycyrrhetic acid-induced apoptosis in thymocytes: impact of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition. American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism. 1999;277(4):E624-E30.
31. Pivato LS, Constantin RP, Ishii-Iwamoto EL, Kelmer-Bracht AM, Yamamoto NS, Constantin J, et al. Metabolic effects of carbenoxolone in rat liver. J Biochem Mol Toxicol. 2006;20(5):230-40.
32. Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ. Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. Biol Reprod. 2000;63(6):1913-7.
33. Mirkina II, Mernenko OA, Satpaev DK, Karelin AA, Blishchenko EYu. Cytolytic processes induced by TNF in L929 and K562 differ in DNA fragmentation mechanisms. Immunol Lett. 1996;52(2-3):105-8.
34. Wu YH, You Y, Chen ZC, Zou P. Reversal of drug resistance by silencing Survivin gene expression in acute myeloid leukemia cells. Acta Biochim Pol. 2008;55(4):673-80.
35. Yang S, Xu YH, Wen XH, Chen L, Li X. Effects of survivin antisense oligodeoxynucleotide on drug resistance in K562 cells. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2008;39(6):905-8.
36. Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Clin Cancer Res. 2002;8(6):1681-94.
37. Voutsas IF, Gritzapis AD, Alexis MN, Katsanou ES, Perez S, Baxevanis CN, et al. A novel quantitative flow cytometric method for measuring glucocorticoid receptor (GR) in cell lines: correlation with the biochemical determination of GR. J Immunol Methods. 2007;324(1-2):110-9.
38. Winmill RE, Hedrick MS. Gap junction blockade with carbenoxolone differentially affects fictive breathing in larval and adult bullfrogs. Respir Physiol Neurobiol. 2003;138(2-3):239-51.