مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۰۹/هفته دوم دی ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۶

افزایش بیان ژن سرکوبگر متاستازی nm۲۳ در رده‌ی سلولی PC–۳ سرطان پروستات تیمار شده با داروی ایماتینیب

سید عطاءاله سادات شاندیز[۱]، دکتر مهدی شفیعی اردستانی[۲]، دکتر شیوا ایرانی[۳]، دکتر دلاور شهباززاده[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان پروستات یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در کشورهای پیشرفته به شمار می‌رود. نقش ژن nm۲۳ به عنوان یک ژن سرکوبگر متاستازی در بسیاری از سرطان‌ها مشخص شده است. اثرات داروی ایماتینیب به عنوان مهار کننده‌های تیروزین کینازی در تحقیقات و درمان تومورهای جامد نشان داده شده است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی اثرات داروی ایماتینیب بر روی بقای سلولی و بیان ژن سرکوبگر متاستازی nm۲۳ در رده‌ی سلولی سرطانی پروستات بود.

روش‌ها: دراین مطالعه، سلول‌های رده‌ی سرطانی پروستات PC–۳ با غلظت‌های متفاوت ایماتینیب به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. درصد بقای سلولی توسط روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] انجام گرفت و میزان دوز ۵۰ درصد کشندگی (IC_{50} یا Half maximal inhibitory concentration) تعیین شد. مولکول RNA با استفاده از محلول RNX استخراج شد و سپس سنتز cDNA (Complementary DNA) انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های nm۲۳ و Glyceraldehyde–۳–phosphate dehydrogenase (GAPDH) با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی طراحی شد. میزان بیان ژن nm۲۳ نسبت به ژن GAPDH (ژن مرجع) با استفاده از روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) بررسی شد.

یافته‌ها: اثر مهاری ایماتینیب بر روی بقای سلول‌های PC–۳ متاستازی نشان داده شد. همچنین، نسبت بیان ژن nm۲۳/GAPDH در غلظت ۲۱/۳۳ µM ایماتینیب طی ۴۸ ساعت برابر ۰/۰۲ ± ۱/۶۲ ($P < ۰/۰۱۰$) محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: ایماتینیب می‌تواند از طریق افزایش بیان ژن مهار کننده‌ی متاستازی nm۲۳ باعث کاهش متاستازی در سلول‌های PC–۳ شود.

واژگان کلیدی: ایماتینیب، nm۲۳، سرطان پروستات، متاستازی

ارجاع: سادات شاندیز سید عطاءاله، شفیعی اردستانی مهدی، ایرانی شیوا، شهباززاده دلاور. **افزایش بیان ژن سرکوبگر متاستازی nm۲۳ در رده‌ی سلولی PC–۳ سرطان پروستات تیمار شده با داروی ایماتینیب.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۹): ۱۹۱۷–۱۹۰۷

مقدمه

پروستات به شکل غده‌ای کوچک در زیر مثانه قرار دارد و بخش بالایی مجرای ادراری را در بر می‌گیرد. در کشورهای توسعه یافته، سرطان پروستات دومین سرطان رایج (بعد از سرطان پوست) و دومین سرطان مرگ‌آور (بعد از سرطان ریه) در مردان است. از هر شش مرد، یک نفر به این سرطان مبتلا می‌شود (۱). با افزایش شیوع و

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه رادیوداروییی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر دلاور شهباززاده
Email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir

مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات و نقصان روش‌های شیمی درمانی و پرتو درمانی در شکل‌های پیشرفته‌ی این سرطان، نیاز به شیوه‌های جدیدی برای کنترل این سرطان احساس می‌شود. پیشرفت سرطان در یک دوره‌ی طولانی مدت، به ویژه سرطان پروستات که در جمعیت میانسال یا پیر دیده می‌شود، نشان دهنده‌ی این است که تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی زیادی برای رشد و پیشرفت سرطان پروستات لازم است (۲).

شیمی درمانی متداول اگر چه بر علیه آنزیم‌ها و ماکرومولکول‌های ویژه است، اما به طور کارا توانایی تشخیص بین سلول‌های طبیعی تند تقسیم شونده و توموری را ندارد. بنابراین، منجر به اثرات جانبی توکسیک می‌شود. بر خلاف آن، درمان‌های هدف‌دار شده با اهداف مولکولی، در مداخله‌ی رشد و یا پیشرفت تومور نقش دارند. در سال‌های اخیر، یافته‌های دقیقی از آسیب‌شناسی فرایند رشد و پیشرفت تومور وجود دارد. بنابراین، ساخت داروهای جدید علیه چرخه‌هایی با پیام‌رسانی کنترل نشده امکان پذیر است. در بین اهداف اصلی، تیروزین کینازها، که در چرخه‌ی ترارسانی پیام سلولی نقش دارند، در بسیاری از انواع سلول‌های سرطانی بیان افزایش یافته‌ای دارند (۳) و به عنوان هدفی جذاب در درمان نوین سرطان مطرح شده‌اند. بعضی از مهار کننده‌های تیروزین کینازی نتایج امیدبخشی را در مطالعات پیش کلینیکی نشان داده‌اند و توانایی جلوگیری از رشد تومور و در بعضی موارد رگ‌زایی را نیز دارا هستند (۴).

این داروها به طور چشمگیری در درمان تومورهای مختلف انسانی همچون معده، پروستات، پستان و لوسمی مؤثر بوده‌اند. یکی از مثال‌های موفقیت‌آمیز مهار کننده‌های کینازی، داروی ضد سرطانی ایماتینیب (مهار کننده‌ی انکوپروتئین Bcr/Ab۱) است که از سال ۲۰۰۱ با تأیید سازمان غذا و داروی امریکا برای درمان لوسمی میلوئید مزمن (CML یا Chronic myeloid leukemia) حاصل جابه‌جایی کروموزومی ۹ و ۲۲، مورد استفاده قرار گرفت و امروزه بخشی از درمان استاندارد لوسمی میلوئیدی مزمن و تومورهای استرومایی معدی-روده‌ای به شمار می‌رود. این دارو در اروپا با نام Glivec و در امریکا با نام Gleevec شناخته می‌شود. ایماتینیب به عنوان دارویی که در بیماران مبتلا به سرطان به راحتی تحمل می‌شود، شناخته شده است. بنابراین به عنوان داروی انتخابی به جای داروهای شیمی درمانی در حوزه‌ی سرطان انتخاب شده است (۶-۵).

علاوه بر این، ثابت شده است که ایماتینیب فعالیت ضد تکثیری در تومورهای جامد (Solid) با مهار پیام‌رسانی گیرنده‌های تیروزین کینازی از قبیل c-kit، گیرنده‌ی عامل رشد مشتق از پلاکت PDGFR α و β (Platelet-derived growth factor receptor α, β) دارد. بیان این گیرنده‌ها در بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله مغز، ملانوما، سرطان‌های پستان، پانکراس، پروستات و تخمدان شناسایی شده است (۷).

متاستاز سرطان، علت اصلی مرگ بیماران سرطانی است. در حالی که تومور اولیه توسط جراحی و رادیو درمانی قابل ریشه‌کن کردن است، درمان فرم‌های متاستازی به سبب پراکنده شدن در سراسر بدن مشکل است و در نهایت، منجر به مرگ بیمار می‌شود. در طی پیشرفت تومور بسیاری از ژن‌ها

عملکرد خود را به دست می‌آورند و یا از دست می‌دهند. این امر، منجر به فراهم آمدن زمینه‌های ایجاد متاستاز از قبیل اتصال سلولی تغییر یافته، تکثیر کنترل نشده، افزایش تحرک، هجوم و رشد مستقل می‌شود. مکانیسم سلولی و مولکولی شکل‌گیری مراحل چندگانه‌ی آبشار متاستاز به طور تقریبی پیچیده است و مکانیسم‌های مشخص در هر جایگاه به طور کامل شناخته نشده است. بیش از ۲۰ ژن از جمله ژن‌های nm۲۳ (NME۱)، KAI۱، CD۴۴، N,E Cadherin، JNKK۱/MKK۴، RKIP و KiSS۱ به عنوان مهار کننده‌های فرایند متاستاز شناسایی شده‌اند که بیان آن‌ها در طی متاستازی کاهش می‌یابد (۸).

محصول ژن nm۲۳، پروتئینی با اندازه‌ی kDa ۱۸/۵ را ایجاد می‌کند که به عنوان نوکلئوزید دی‌فسفات کیناز یا هیستیدین کیناز عمل می‌کند. گزارشات حاکی از آن است که محصول پروتئینی ژن nm۲۳ کمپلکسی را با سرکوبگر کیناز Ras۱ (Kinase Suppressor of Ras یا KSR۱) تشکیل می‌دهد و سبب فسفریلاسیون این پروتئین می‌شود. بنابراین در مهار چرخه‌ی Ras/MAPK (Ras/Mitogen-activated protein kinase) نقش دارد (۹). از لحاظ کلینیکی مشخص شده است که بیان ژن nm۲۳ در بسیاری از تومورها از جمله سرطان‌های پستان و پروستات کاهش می‌یابد (۱۰). از این رو، انجام تحقیقاتی در مورد شناسایی مسیرهای عملکردی و مکانیسم متاستازی مرتبط با آن ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر داروی ایماتینیب بر چسبندگی، مهاجرت و تهاجم سلول‌های PC-۳ (Human prostate adenocarcinoma) از طریق تنظیم بیان ژن nm۲۳ بوده است.

روش‌ها

کشت سلولی: رده‌ی سلولی PC-۳ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد (NCBI,C۴۲۷). این رده‌ی سلولی، در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum)، ۲ g/l بی‌کربنات، ۲ mM گلوتامین، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در دمای ۳۷ C^o در یک اتمسفر مرطوب با غلظت پنج درصد CO_2 کشت شد.

انکوباسیون سلول‌ها با ایماتینیب: انکوباسیون غلظت‌های مختلفی از داروی ایماتینیب (۰، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FBS انجام گرفت. به منظور بررسی اثر سمیت سلولی این ترکیبات، از روش سنجش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم محلول به فرمازان نامحلول است. ابتدا در پلیت ۹۶ خانه‌ای، به میزان ۱۰۰ µl از سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۰۰۰۰ سلول محیط کشت ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت رویی برداشته شد و دارو اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط ۳۷ C^o در یک اتمسفر مرطوب با غلظت پنج درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، ۱۰ µl از محلول رنگ MTT (۵ mg/ml از Phosphate buffered saline یا PBS) به هر چاهک اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون، کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان ایجاد شد. برای حل نمودن کریستال‌های فورمازان، ۱۰۰ µl

ایزوپروپانول به هر چاهک افزوده شد. سپس شدت رنگ توسط دستگاه ELISA reader (Oraganon Teknika, Netherlands) در طول موج ۵۴۰ nm ثبت شد. شش چاهک حاوی سلول‌های PC-۳ بدون تیمار به عنوان شاهد منفی انتخاب شدند. نتایج بر حسب درصد سلول‌های زنده‌ی تیمار شده نسبت به شاهد، از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

۱۰۰ × (میانگین جذب سلول‌های شاهد/ میانگین جذب سلول‌های تیمار شده) = درصد سلول‌های زنده

برای تعیین دوز ۵۰ درصد کشندگی ایماتینیب بر روی رده‌ی سلولی PC-۳، تمامی اطلاعات به دست آمده (درصد سمیت) از نمونه‌های مورد و شاهد با استفاده از نرم‌افزار Statistical package (Pharm-PCS) بررسی شد و میزان دقیق IC_{50} (Half maximal inhibitory concentration) مربوط تعیین شد.

استخراج RNA: ابتدا ۲×۱۰^{۶} سلول در فلاسک‌های $۲۵\ cm^{۲}$ ریخته شد و بعد از ۴۸ ساعت با ایماتینیب تیمار شد و پس آن استخراج RNA انجام گردید. برای جداسازی سلول‌ها از ته فلاسک، سلول‌ها با تریپسین جدا و با سرعت ۱۱۰۰ rpm سانتریفوژ و سپس دو مرتبه با PBS شستشو شدند. سپس برای لیز کردن سلول‌ها، به آن‌ها ml محلول استخراج RNX (سیناژن، ایران) سرد اضافه شد. سپس محتویات هر فالکون در میکروتیوب‌های فاقد آنزیم RNase ریخته شد. نمونه‌های همگن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس، میزان ۲۰۰ µl کلروفرم به هر نمونه افزوده شد و پس از تکان دادن شدید به مدت ۱۵ ثانیه و ۵ دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای $۴\ ^{o}C$ سانتریفوژ (Eppendorf ۵۸۰۴R ،Germany) شدند. قسمت آبی بالایی با حجم برابری از ایزوپروپانول مخلوط شد و پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای $۴\ ^{o}C$ با سرعت ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس اتانول ۷۵ درصد به رسوب RNA اضافه شد. در ادامه، سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای $۴\ ^{o}C$ با سرعت ۷۵۰۰ rpm صورت گرفت تا RNA شسته شود. در مرحله‌ی آخر، RNA در آب مقطر دو بار تقطیر حل و در فریزر $-۷۰\ ^{o}C$ نگهداری شد.

ارزیابی خلوص و کیفیت RNA استخراج شده: در این مرحله، مقدار و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از فتونانومتر (IMPLEN GmbH,Germany) تعیین شد. نسبت جذب نوری (OD یا Optical density) RNA در طول موج‌های ۲۶۰ nm به ۲۸۰ nm و ۲۶۰ nm به ۲۳۰ nm سنجش شد. از نمونه‌هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ nm میان ۱/۸ تا ۲/۲ و نسبت ۲۶۰/۲۳۰ nm میان ۱/۷ تا ۱/۹ داشتند، برای سنتز cDNA (complementary DNA) استفاده شد.

ساخت DNA مکمل (cDNA): مولکول‌های DNA مکمل با کیت Revert aidTM first strand cDNA synthesis Kit (Fermentas ,USA) ساخته شدند. مخلوط واکنش شامل ۱ µg RNA، ۵ µl بافر واکنش ۵x، ۰/۵ µl آغازگر (dT) Oligo، ۰/۵ lµ آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۲ µl مخلوط داکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (۱۰ mM)، ۱ µl مهار کننده‌ی آنزیم RNase (۲۰ U/µl)، ۱ µl آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ µl) بود. سپس برنامه‌ی دمایی- زمانی

به صورت ^{o}C ۲۵ به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ^{o}C ۴۲ به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ^{o}C ۷۰ به مدت ۵ دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت‌بردار معکوس) و ^{o}C ۴ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. واکنش PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از دستگاه Real-time PCR مدل ABI ۷۳۰۰ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) انجام گرفت.

الکتروفورز با ژل آگارز: ابتدا ژل آگارز ۱/۵ درصد (۱/۵ g پودر آگارز در ۱۰۰ ml بافر TBE ۰/۵x (Tris-Borate-EDTA) مخلوط با رنگ اتیدیوم بروماید آماده شد. سپس محصولات تکثیر شده‌ی ژن هدف و مرجع، طی Real-time PCR، روی ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز شد. این مرحله برای تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و جفت شدن آغازگرها انجام شد.

طراحی آغازگرها: در این مطالعه ژن nm۲۳ واقع بر روی کروموزوم ۱۷ (q۲۱/۳) ۱۷ به عنوان ژن مورد مطالعه و ژن GAPDH واقع بر کروموزوم ۱۲ (p۱۳) ۱۲ به عنوان ژن مرجع انتخاب شد. سپس توالی ژن‌ها از سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov گرفته شد. با نرم‌افزار Gene runner برای ژن‌های مورد مطالعه، آغازگرهای اختصاصی طراحی شد.

توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف nm۲۳ به صورت ۵'-ATGGCCAACTGTGAGCGTACC-۳' جلویی، دمای ^{o}C ۶۹ و ۵'-CATGTATTTCACCAGGCCGGC-۳' برگشتی، دمای ^{o}C ۶۴/۲، برای ژن مرجع GAPDH به صورت ۵'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-۳' جلویی، دمای ^{o}C ۶۶/۹ و ۵'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-۳' برگشتی، دمای ^{o}C ۶۳/۴ بود. برای درستی توالی آغازگرها و اطمینان از عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیر اختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) شدند.

Real-time PCR: در این مطالعه، برنامه‌ی زمانی-دمایی دستگاه Real-time PCR در سه مرحله انجام شد. مرحله‌ی اول که منجر به واسرشته شدن مولکول‌های cDNA و فعال شدن آنزیم پلیمراز می‌شود، به صورت ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله‌ی دوم ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه و ^{o}C ۶۰ به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه‌ی متوالی و مرحله‌ی نهایی برای ترسیم منحنی ذوب (Melting curve) به صورت ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ^{o}C ۶۰ به مدت ۳۰ ثانیه و ^{o}C ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-time PCR در حجم نهایی ۲۵ µl به صورت تکرار سه‌تایی در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲/۵ µl مخلوط اصلی واکنش PCR حاوی سایبرگرین (SYBER-Green PCR master mix) ۱ µl (Applied Biosystems, Warrington, UK) (۴۰۰ nM) از آغازگرهای جلویی و برگشتی اختصاصی هر ژن، ۵ µl cDNA (۱۰۰ ng) و مابقی آب مقطر اضافه شد تا به حجم نهایی ۲۵ µl رسید. سپس برای هر واکنش PCR یک منحنی تکثیر (Amplification curve) رسم شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس مقایسه‌ی چرخه‌ی آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌ی آستانه‌ی به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با ایماتینیب) و نمونه‌های شاهد (سلول‌های

تیمار نشده با ایماتینیب) محاسبه و با استفاده از فرمول ΔΔCt، نسبت ژن هدف به ژن مرجع از طریق $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه، بر اساس حداقل سه تکرار استوار است که با گرفتن میانگین و محاسبه‌ی انحراف معیار میزان تغییرات محاسبه شد. از آزمون مقایسه‌ای t استفاده و P < ۰/۰۵۰ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

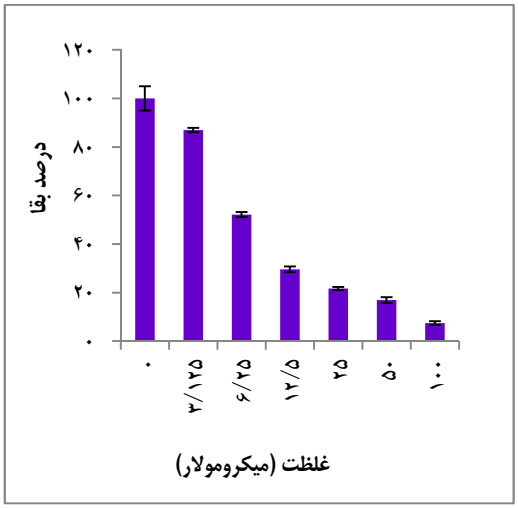
یافته‌ها

تیمار سلول‌های PC-۳ با ایماتینیب و محاسبه‌ی $IC_{۵۰}$

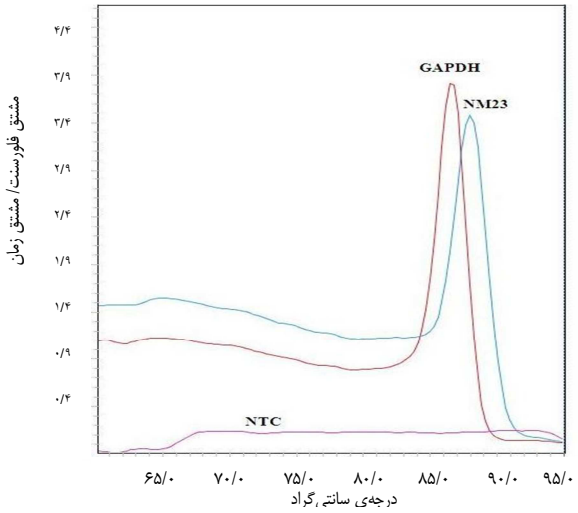
تیمار سلول‌های PC-۳ با غلظت‌های مختلف ایماتینیب ۰ Mμ، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴۸ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به مقادیر ۰/۸۶ ± ۸۶/۹۰ (P < ۰/۰۵۰)، ۱/۰۴ ± ۵۲/۰۹ (P < ۰/۰۱۰)، ۱/۱۸ ± ۲۹/۶۹ (P < ۰/۰۱۰)، ۰/۶۵ ± ۲۱/۷۰ (P < ۰/۰۰۱)، ۱/۱۸ ± ۱۶/۸۴ (P < ۰/۰۰۱) و ۰/۷۴ ± ۷/۴۳ (P < ۰/۰۰۱) می‌شود. این نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از تیمار سلول سرطانی PC-۳ با غلظت‌های متفاوت با استفاده از نرم‌افزار Pharm، میزان IC۵۰ برای ایماتینیب ۲۱/۳۳ Mμ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب و ژل الکتروفورز

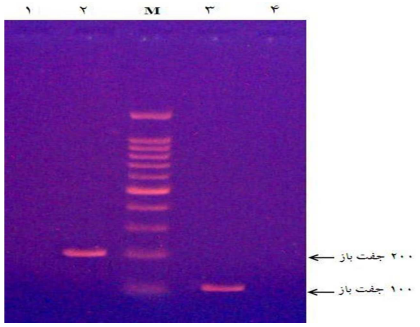
تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد (شکل ۲). همچنین محصولات PCR هر ژن الکتروفورز شد. نتایج حاصل، تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود (شکل ۳).



شکل ۱. درصد بقای سلول‌های PC-۳ در برابر غلظت‌های مختلف ایماتینیب در مدت زمان ۴۸ ساعت، نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های شاهد و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.



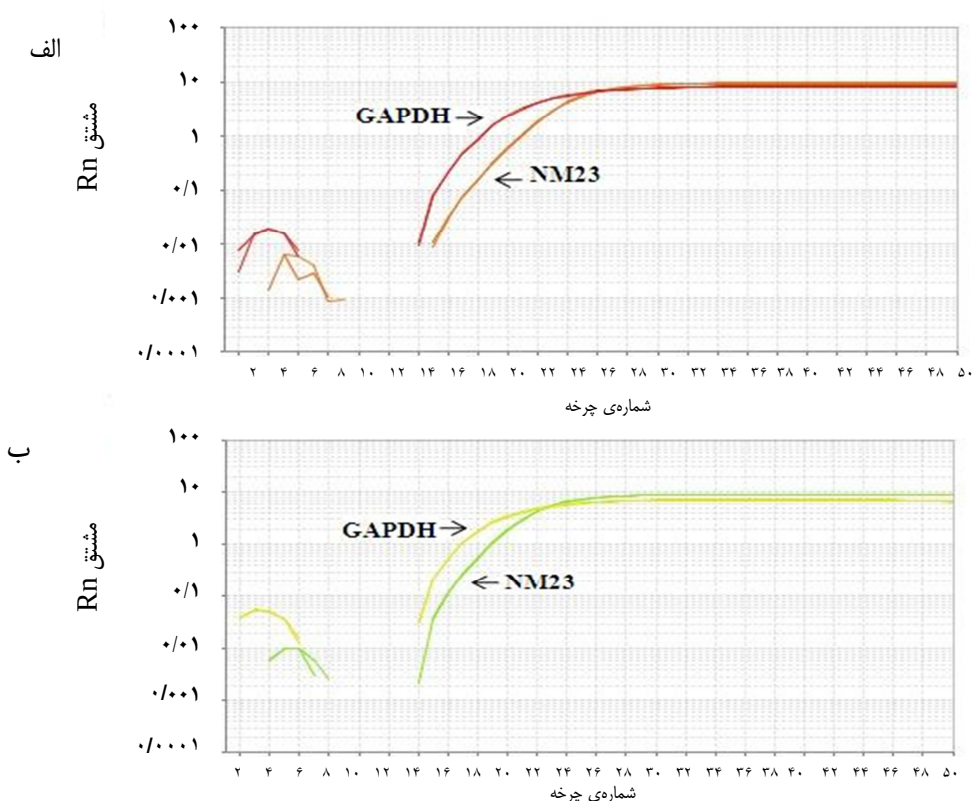
شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های nm۲۳ و GAPDH (Glyceraldehyde-۳-phosphate dehydrogenase) که محور عمودی نشان دهنده‌ی مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده‌ی درجه‌ی سانتی‌گراد است. الگوی منحنی ذوب ژن GAPDH ۸۶/۸۱ °C و منحنی ذوب ژن nm۲۳ در دمای ۸۷/۹۴ °C نشان داده شده است. NTC (Non template control). نمونه‌ی شاهد بدون الگو می‌باشد. در این واکنش، علامت فلورسنت به صورت خطی است که بیانگر عدم جفت شدن آغازگرها و فقدان باند غیر اختصاصی است.



شکل ۳. الکتروفورز محصولات تکثیری ژن‌های nm۲۳ و GAPDH (Glyceraldehyde-۳-phosphate dehydrogenase) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک‌های ۱ و ۴ به ترتیب واکنش‌های بدون الگوی ژن‌های nm۲۳ و GAPDH را نشان می‌دهند. چاهک ۲ محصول تکثیری ژن nm۲۳ را نشان می‌دهد. طول قطعه‌ی تکثیری ۲۰۴ جفت باز است. چاهک ۳ محصول تکثیری ژن GAPDH را نشان می‌دهد. طول قطعه‌ی تکثیری، ۱۰۲جفت باز است. چاهک M نشانگرهای اندازه (Size markers) با اندازه‌ی ۱۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد

نتایج Real-time PCR و منحنی تکثیری

در نمونه‌ی شاهد چرخه‌ی آستانه‌ی ژن‌های GAPDH و nm۲۳ به ترتیب برابر با ۱۸/۶ و ۲۱/۰۲ بود. در نمونه‌ی تیمار شده با غلظت ۲۱/۳۳ µg/ml ایماتینیب چرخه‌ی آستانه‌ی ژن‌های GAPDH و nm۲۳ برابر با ۱۷/۳۴ و ۱۹/۰۱ به دست آمد (شکل ۴). اختلاف چرخه‌ی آستانه‌ی ژن مرجع و ژن nm۲۳ در نمونه‌ی شاهد با نمونه‌ی تیمار شده با ایماتینیب ۰/۶۸۴ (ΔΔCt = −۰/۶۸۴) محاسبه شد. نسبت بیان ژن nm۲۳/GAPDH در غلظت ۲۱/۳۳ µM ایماتینیب برابر ۰/۰۲ ± ۱/۶۲ (P < ۰/۰۱۰) محاسبه شد.



شکل ۴. منحنی‌های تکثیر ژن‌های GAPDH (Glyceraldehyde-۳-phosphate dehydrogenase) و nm۲۳ (الف) در نمونه‌ی شاهد، چرخه‌ی آستانه‌ی ژن‌های GAPDH و nm۲۳ به ترتیب برابر با ۱۸/۶ و ۲۱/۰۲ است. (ب) در نمونه‌ی تیمار شده با داروی ایماتینیب چرخه‌ی آستانه‌ی ژن‌های GAPDH و nm۲۳ برابر با ۱۷/۳۴ و ۱۹/۰۱ است

بحث

تنوع و گستردگی شیوع سرطان در طول سال‌های گذشته موجب تکامل روش‌های درمانی متنوعی شده است که بسته به نوع، موقعیت، میزان پیشرفت، وسعت بیماری و وضعیت بیمار ترکیبی از روش‌های مختلف جهت مبارزه با سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. متاستازی یک فرایند پیچیده‌ی ژنتیکی است که ژن‌های زیادی در آن درگیر هستند. در میان همه‌ی تغییرات ژنتیکی، غیر فعال شدن ژن‌های مهار کننده‌ی متاستازی یکی از مهم‌ترین عوامل است که در شکل‌گیری فرم متاستازی نقش دارد. در سال‌های اخیر، ژن‌های سرکوبگر متاستازی متعددی شناسایی شده‌اند که در کنترل سرطان‌ها نقش دارند. ژن nm۲۳ و محصول پروتئینی آن که فعالیت نوکلئوتید دی‌فسفات کینازی دارد از این دسته ژن‌ها است که انواع مختلفی از H۱ تا H۸ برای آن شناسایی شده‌اند، اما تنها nm۲۳-H۱ و H۲ در انسان دارای عملکرد شناخته شده هستند (۱۲-۱۱).

در بسیاری از کارسینوم‌های انسانی از جمله کارسینوم پستان (۱۳)، ملانوم (۱۴)، هپاتوسلولار کارسینوم (۱۵) و تخمدان (۱۶)، ارتباط بین کاهش بیان nm۲۳ با افزایش پتانسیل متاستاز نشان داده شده است. در برخی از بدخیمی‌ها از جمله نئوپلاسم‌های هماتولوژیک (۱۷) و کارسینوم پروستات (۱۸) بروز بالای nm۲۳ با پیش‌آگهی بدی همراه است. از زمان کشف داروی ایماتینیب به عنوان اولین مهار کننده‌ی کینازی و استفاده‌ی بالینی آن، تحقیقات زیادی در زمینه‌ی شناسایی مکانیسم عملکرد آن روی سلول‌های سرطانی مختلف در حال انجام است. پژوهش‌های مختلفی، اثر داروی ایماتینیب را بر روی اهداف مولکولی درون سلولی رده‌های سرطان لوسمی میلوئیدی مزمن (CML یا Chronic myelogenous) نشان داده‌اند (۱۹).

همچنین، اثرات مهاری و سلول‌کشی این دارو به صورت In vitro و هم In vivo در بسیاری از سرطان‌ها مورد بررسی و اثبات قرار گرفته شده است. برای مثال در تحقیقی اثر مهاری ایماتینیب بر روی رده‌ی سلولی سرطانی پستان MCFV (Michigan cancer foundation-۷) نشان داده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ایماتینیب منجر به مهار رشد سلولی، افزایش آپوپتوز و کاهش مهاجرت این رده‌ی سلولی می‌شود (۲۰). Popow-Wozniak و همکاران اثر مهاری داروی ایماتینیب بر روی سلول‌های آدنوکارسینومای کلون را بررسی کردند و نشان دادند که این دارو بر روی پلیمریزاسیون اکتین، سازمان‌یابی اسکلت سلولی اکتین، القای آپوپتوز و مهار مهاجرت این سلول‌ها مؤثر است (۲۱).

تحقیق دیگری توسط Weigel و همکاران برای تعیین کارایی ایماتینیب در رادیو درمانی رده‌های سلولی سرطان پستان MCFV و MB۲۳۱ MDA انجام گرفت. آن‌ها نشان دادند که ترکیب ایماتینیب و رادیو درمانی اثرات مؤثری را در مهار تکثیر سلولی، مهاجرت و افزایش آپوپتوز در مقایسه با رادیو درمانی تنها دارد (۲۲). همچنین مهار رشد توموری ایماتینیب نیز روی رده‌ی سلولی سرطان تخمدان، سلول‌های سرطانی تیروئید و سلول‌های لایدیگ در شرایط In vitro و In vivo نیز نشان داده شده است (۲۵-۲۳).

تحقیقات صورت گرفته بر روی بیان ژن‌های مرتبط با مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده مانند BAX،

BAD و BCL۲ (۲) و همچنین، PDGFαβ (Platelet derived growth factorαβ) در سلول‌های سرطانی تیمار شده با ایماتینیب نشان داده‌اند که بیان این ژن‌ها به صورت گوناگون در اثر تیمار با ایماتینیب تغییر می‌کنند (۲۷-۲۶). در این مطالعه از سلول‌های PC-۳ استفاده شد؛ چرا که این رده‌ی سلولی از سرطان‌های پروستات، رفتار تهاجمی بیشتری در مقایسه با سلول‌های DU۱۴۵ و LNCaP، دو رده‌ی دیگر سلول‌های سرطان پروستات، را دارا می‌باشد. تاکنون مطالعه‌ای در مورد افزایش بیان ژن nm۲۳ به طور کمی در رده‌ی سلولی PC-۳ با تیمار داروی ایماتینیب صورت نگرفته است. در مطالعه‌ی حاضر روی سلول‌های PC-۳ مشاهده شد که آثار سمیت ایماتینیب با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. همچنین در مطالعه‌ی حاضر، تغییر بیان پروتئین ژن سرکوبگر متاستازی nm۲۳ در سطح mRNA بررسی شد و باید در مطالعات آینده، بیان آن در سطح پروتئین مورد ارزیابی قرار گیرد. افزایش بیان ژن nm۲۳ در رده‌ی سرطانی PC-۳ در مدت ۴۸ ساعت می‌تواند افقی تازه در درمان سرطان پروستات از طریق مهار متاستازی باشد. بدیهی است که شناسایی اهمیت الگوی بیان این ژن در پاسخ به فعالیت متاستازی داروهای ضد سرطانی حایز اهمیت است. بنابراین بررسی‌های بیشتری لازم است تا بتوان اثبات کرد که «آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن می‌تواند مدرکی برای نقش آن در پیش‌گویی دقیق‌تر و اختصاصی پاسخ سرطان به درمان باشد؟».

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای تخصصی به شماره‌ی ۱۵۷۰۳۲ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است.

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin 2014; 64(1): 9-29.
2. Noori Daloii MR, brahimzadeh Vesal E. Molecular genetic, diagnosis, prevention and gene therapy in prostatic cancer: review article. Tehran Univ Med J 2009; 67(1): 1-14. [In Persian].
3. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. Nanomedicine 2014; 10(1): 19-34.
4. Gur S, Sikka SC, Abdel-Mageed AB, Abd Elmageed ZY, Rezk B, Pankey E, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) induces human corpus cavernosum relaxation by inhibiting receptor tyrosine kinases (RTKs): identification of new RTK targets. Urology 2013; 82(3): 745-6.
5. Tornillo L. Biology of gastrointestinal stromal tumour and mechanisms of imatinib resistance. Diagnostic Histopathology 2013; 19(6): 203-10.
6. Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, Ferriola D, Majsterek I. Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. Anticancer Agents Med Chem 2009; 9(1): 66-76.
7. Weigel MT, Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag DO, Schem C, Bauer M, Jonat W, et al. Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR beta signalling. Cancer Lett 2009; 273(1): 70-9.
8. Iiizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. Biochim Biophys Acta 2008; 1786(2): 87-104.
9. Prabhu VV, Siddikuzzaman, Grace VM, Guruvayoorappan C. Targeting tumor metastasis by regulating Nm23 gene expression. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(8): 3539-48.
10. Haeno H, Michor F. The evolution of tumor metastases during clonal expansion. J Theor Biol 2010; 263(1): 30-44.
11. Fournier HN, Albiges-Rizo C, Block MR. New insights into Nm23 control of cell adhesion and

migration. J Bioenerg Biomembr 2003; 35(1): 81-7.
12. Royds JA, Silcocks PB, Rees RC, Stephenson TJ. Nm23 protein expression in thyroid neoplasms. Pathologica 1994; 86(3): 240-3.
13. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. Cancer Res 1989; 49(18): 5185-90.
14. Caligo MA, Grammatico P, Cipollini G, Varesco L, Del PG, Bevilacqua G. A low NM23.H1 gene expression identifying high malignancy human melanomas. Melanoma Res 1994; 4(3): 179-84.
15. Boix L, Bruix J, Campo E, Sole M, Castells A, Fuster J, et al. nm23-H1 expression and disease recurrence after surgical resection of small hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 1994; 107(2): 486-91.
16. Kapitanovic S, Spaventi R, Vujsic S, Petrovic Z, Kurjak A, Pavelic ZP, et al. nm23-H1 gene expression in ovarian tumors--a potential tumor marker. Anticancer Res 1995; 15(2): 587-90.
17. Wakimoto N, Yokoyama A, Okabe-Kado J, Nagata N, Motoyoshi K, Honma Y. Combined analysis of differentiation inhibitory factor nm23-H1 and nm23-H2 as prognostic factors in acute myeloid leukaemia. Br J Cancer 1998; 77(12): 2298-303.
18. Igawa M, Urakami S, Shiina H, Ishibe T, Usui T, Chodak GW. Association of nm23 protein levels in human prostates with proliferating cell nuclear antigen expression at autopsy. Eur Urol 1996; 30(3): 383-7.
19. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacol Res 2014; 79: 34-74.
20. Rocha A, Azevedo I, Soares R. Progesterone sensitizes breast cancer MCF7 cells to imatinib inhibitory effects. J Cell Biochem 2008; 103(2): 607-14.
21. Popow-Wozniak A, Wozniakowska A, Kaczmarek L, Malicka-Blaszkiewicz M, Nowak D. Apoptotic effect of imatinib on human colon adenocarcinoma cells: influence on actin cytoskeleton organization and cell migration. Eur J Pharmacol 2011; 667(1-3): 66-73.
22. Weigel MT, Dahmke L, Schem C, Bauerschlag DO, Weber K, Niehoff P, et al. In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells. BMC Cancer 2010; 10: 412.
23. Basciani S, Brama M, Mariani S, De LG, Arizzi M, Vesci L, et al. Imatinib mesylate inhibits Leydig cell tumor growth: evidence for in vitro and in vivo activity. Cancer Res 2005; 65(5): 1897-903.
24. Reynoso D, Nolden LK, Yang D, Dumont SN, Conley AP, Dumont AG, et al. Synergistic induction of apoptosis by the Bcl-2 inhibitor ABT-737 and imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumor cells. Mol Oncol 2011; 5(1): 93-104.
25. Abouantoun TJ, MacDonald TJ. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. Mol Cancer Ther 2009; 8(5): 1137-47.
26. Biswas SK, Zhao Y, Sandirasegarane L. Imatinib induces apoptosis by inhibiting. Mol Vis 2009; 15: 1599-610.
27. Patel BB, He YA, Li XM, Frolov A, Vanderveer L, Slater C, et al. Molecular mechanisms of action of imatinib mesylate in human ovarian cancer: a proteomic analysis. Cancer Genomics Proteomics 2008; 5(3-4): 137-49.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 29.09.2014
Vol. 32, No. 309, 2nd Week, January 2015
Accepted: 07.12.2014

Upregulation of Nm23, a Metastasis Suppressor Gene, in Human Prostate Adenocarcinoma (PC-3) Cell Line Treated with Imatinib

Seyed Ataollah Sadat-Shandiz MSc[1], Mehdi Shafiee-Ardestani PhD[2], Shiva Irani PhD[3], Delavar Shahbazzadeh PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Prostate cancer is one of the most common cancers diagnosed in developed countries. Many studies have confirmed that the nm23 gene suppresses metastasis in different types of cancers. The effects of, imatinib as the first member of tyrosine kinases inhibitors, were showed in research and treatment of solid tumors. The aim of the current study was to investigate the effect of imatinib on cell viability and suppressor metastasis nm23 gene expression in prostate cancer cell line.

Methods: In this study, prostate cancer (PC-3) human cell line was treated with various concentrations of imatinib for 48 hours. Cell viability was assessed using MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was determined. We extracted RNA molecules via using RNX solution, after which cDNA was synthesized. The precise primers for the nm23 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes were designed via specific software. Then, the quantity of nm23 compared to GAPDH gene (reference gene) was analyzed using real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: Imatinib exerted an inhibitory effect on the viability of metastatic PC-3 cells. The calculated nm23/GAPDH gene expression ratio was 1.62 ± 0.02 ($P < 0.01$) in 21/33 μM concentration of imatinib at 48 hours.

Conclusion: The results of this study showed that imatinib can inhibit metastasis via upregulating nm23 gene expression in prostate cancer adenocarcinoma PC-3 cell line.

Keywords: Imatinib, nm23, Prostate cancer, Metastasis

Citation: Sadat-Shandiz SA, Shafiee-Ardestani M, Irani Sh, Shahbazzadeh D. **Upregulation of Nm23, a Metastasis Suppressor Gene, in Human Prostate Adenocarcinoma (PC-3) Cell Line Treated with Imatinib.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(309): 1907-17

1- PhD Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Radiopharmacy, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran AND Medical Biotechnology Group, Venom and Toxin Lab, Tehran, Iran
Corresponding Author: Delavar Shahbazzadeh PhD, Email: shahbazzadeh@pasteur.ac.ir