

## مهار مقاومت دارویی چندگانه در سلول‌های لوسمیگ به وسیله‌ی Short interfering RNA

دکتر فاطمه نادعلی\*، دکتر کامران علی‌مقدم\*\*، شهربانو رستمی\*\*\*،

دکتر حمید الله غفاری\*\*\*\*، دکتر اردشیر قوام زاده\*\*\*\*\*

\* استادیار هماتولوژی، گروه آسیب شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*\* دانشیار هماتولوژی - انکولوژی، مرکز تحقیقات خون انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\*\*\* دانشجوی دکتری هماتولوژی، مرکز تحقیقات خون انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\*\*\*\* استادیار ژنتیک، مرکز تحقیقات خون انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\*\*\*\*\* استاد هماتولوژی-انکولوژی، مرکز تحقیقات خون انکولوژی و پیوند مغز استخوان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۱۷

### چکیده

لوسمی حاد میلو بلاستیک شایع‌ترین نوع لوسمی در بالغین است. مشکل اصلی این بیماری پیدایش سلول‌های مقاوم و ایجاد مقاومت نسبت به داروهای ضد سرطان است. این پدیده‌ی مقاومت دارویی چندگانه یا Multidrug Resistance (MDR) نام دارد. یکی از علت‌های مقاومت دارویی بیان ژن MDR1 و محصول آن یعنی گلیکوپروتئین P می‌باشد. در این مطالعه سعی شده است که از طریق مهار MDR1/mRNA با استفاده از siRNA و دو وکتور غیرویروسی با فنوتیپ مقاومت دارویی ناشی از گلیکوپروتئین P مقابله شود.

مقدمه:

رده‌ی سلولی K562 توسط داروی دوکسوروبی سین مقاوم و KDI/20 نامیده شده است. به منظور بر عکس کردن فنوتیپ MDR ناشی از گلیکوپروتئین P علیه MDR1 /mRNA سنتز siRNA صورت گرفت. سپس siRNA توسط یک وکتور غیرویروسی لیپیدی به نام Fugene 6 و یک وکتور غیر ویروسی شیمیایی به نام Polyethylenimine (PEI) اثر داده شد. سپس اثر آن در سطح سلولی به وسیله‌ی بررسی بیان گلیکوپروتئین P توسط روش فلوسیتومتری و در سطح مولکولی به وسیله‌ی Real-time PCR بررسی شد. در این روش ۷۹ درصد کاهش در گلیکوپروتئین P با استفاده از siRNA و وکتور Fugene 6 و ۸۶ درصد کاهش در گلیکوپروتئین P با استفاده از siRNA و وکتور Polyethylenimine مشاهده شد. کاهش MDR1/mRNA در سطح مولکولی و به روش Real time PCR به ترتیب ۶۲ و ۷۴ درصد بود و اختلاف این دو معنی‌دار نبود.

روش‌ها:

یافته‌ها:

siRNA به عنوان یک روش مؤثر خاموش‌سازی ژن در مرحله‌ی بعد از نسخه‌برداری عمل می‌کند و اختلاف معنی‌داری بین دو وکتور غیر ویروسی برای انتقال siRNA به داخل سلول و مهار بیان ژن MDR1 دیده نشد.

نتیجه‌گیری:

siRNA، ژن MDR1، گلیکو پروتئین P، Multidrug Resistance

واژگان کلیدی:

تعداد صفحات: ۱۰

تعداد جدول‌ها: ۴

تعداد نمودارها: ۳

تعداد منابع: ۳۰

دکتر فاطمه نادعلی، استادیار گروه آسیب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.  
E-mail: nadali@med.mui.ac.ir

آدرس نویسندهٔ مسئول:

## مقدمه

لوسمی حاد میلو بلاستیک ناشی از موتاسیون سوماتیک در سلول‌های بنیادی چند قدرته و یا سلول‌های اجدادی با تمایز کم می‌باشد. این نوع لوسمی غالب در دوران نوزادی است ولی در طفولیت و بلوغ از شیوع آن کاسته می‌شود و در حدود ۲۰-۱۵ درصد لوسمی‌های اطفال و ۸۰ درصد لوسمی‌های بالغین را تشکیل می‌دهد. درمان رایج و استاندارد آن استفاده از داروهای Anthracyclines و Cytarabine به مدت سه و هفت روز می‌باشد. درمان‌های دیگر، استفاده از شیمی درمانی رادیوتراپی به همراه پیوند اتولوگ و یا هترولوگ مغز استخوان است (۱).

در حدود ۱۰ درصد بیماران بالغ که سن آنها بین ۶۰-۱۵ سال است، پس از دریافت شیمی درمانی، در حدود ۵ سال در فاز بهبودی می‌مانند و این در حالی است که ۶۰ درصد بچه‌ها بقای ۵ ساله دارند. به دلیل کاهش تحمل بیماران مسن‌تر نسبت به شیمی درمانی تهاجمی و همچنین طبیعت ذاتی مقاوم به درمان آنها القای بهبودی ضعیف‌تر و مدت بهبودی آنها کوتاه‌تر است (۲).

در افرادی که به درمان پاسخ نمی‌دهند و یا پس از بهبودی بیماری آنها عود می‌کند، سلول‌های مقاوم از درمان اولیه فرار کرده، باعث عود لوسمی می‌شوند و علت عمده‌ی این مقاومت دارویی در لوسمی حاد میلو بلاستیک، به ویژه در افراد مسن بیان بیش از حد ژن، مقاومت دارویی چندگانه یا (MDR1) Multidrug resistance gene می‌باشد و در یک بررسی که بر روی ۲۱۱ بیمار مبتلا به لوسمی حاد میلو بلاستیک بالای ۵۵ سال انجام شده است در ۷۱ درصد آنها ژن MDR1 بیان بیش از حد داشته است

(۳) از طرف دیگر در صورتی که در پروتوانکوژن RAS موتاسیون پیدا شود، میزان بیان ژن MDR1 در لوسمی حاد میلو بلاستیک کاهش می‌یابد و سلول‌های بیمار نسبت به داروهای شیمی درمانی حساس بوده، پاسخ بهتری خواهند داشت (۴).

گاهی سلول‌های بدخیم نسبت به یک داروی خاص مقاوم می‌شوند، مانند مقاومت به Cytarabine که در اثر کمبود آنزیم Deoxycytidine Kinase به وجود می‌آید؛ گاهی نیز سلول‌های توموری نسبت به داروهای مختلف ضد سرطان که از نظر عملکرد و ساختمان شیمیایی با هم متفاوت هستند، مقاوم می‌شوند که در اصطلاح این وضعیت را Multidrug resistance یا مقاومت دارویی چندگانه می‌نامند و این نوع از مقاومت دارویی چندگانه مشکل عمده در درمان تومورهاست (۵).

عوامل مختلف در به وجود آوردن فنوتیپ MDR دخالت دارند که یکی از آنها بیان بیش از حد ژن MDR1 است که محصول آن بر روی سلول به نام P-glycoprotein (pgp) می‌باشد و ژن MDR1 در انسان بر روی کروموزوم شماره‌ی ۷ (7q21.1) قرار دارد (۷-۵).

از آن جایی که pgp به طور طبیعی بر روی بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد، کلیه، پانکراس، روده‌ها، تخمدان، بیضه، سلول‌های لنفوئیدی، سلول‌های CD34<sup>+</sup>، تیروئید و ... بیان می‌شود، لذا در بدخیمی‌های این بافت‌ها و سایر بافت‌های مختلف، ممکن است ژن MDR1 دچار بیان افزایش یافته شود و فنوتیپ مقاومت دارویی را ایجاد کند. به عنوان مثال در طی گزارش‌هایی بیان pgp در لوسمی حاد میلو بلاستیک در هنگام تشخیص بیماری ۴۰-۲۰

**طراحی و ساخت siRNA**

siRNA دو رشته‌ای بر اساس توالی MDR1 mRNA (NM: 000927) طراحی و توسط کمپانی MWG آلمان سنتز و توسط بافر siMAX بنا بر توصیه‌ی کارخانه‌ی سازنده به صورت محلول درآورده شد و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به انتهای رشته‌های RNA توالی TT اضافه شد تا پایدار باقی بماند.

**توالی MDR1 siRNA**

Sense 5- GGAAAAGAAACCAACUGAC-TT-3  
Antisense-GACAGUUGGUUUUUUCC-TT-3

**اثر MDR1 siRNA بر روی سلول‌های مقاوم**

برای انتقال MDR1 siRNA به داخل سلول از دو وکتور غیر ویروسی به نام‌های Fugene 6 (Roche, USA) و Polyethylenimine (PEI, Fermentas, USA) استفاده شد.

ابتدا سلول‌های مقاوم به تعداد  $10^5 \times 5$  cell/ml در محیط کشت RPMI حاوی ده درصد FBS کشت داده شد و سپس  $1 \mu\text{g}$  از siRNA به  $3/3 \mu\text{l}$  از PEI به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه و سپس این کمپلکس به سلول‌ها در محیط کشت اضافه شد. همچنین  $1 \mu\text{g}$  از siRNA به  $3 \mu\text{l}$  از Fugene 6 اضافه و سپس این کمپلکس به سلول‌ها در محیط کشت اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور مرطوب با ۵٪ گاز  $\text{CO}_2$  و  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شد. سپس سلول‌ها از انکوباتور خارج و با سرم فیزیولوژی استریل شستشو شد و بر روی آنها فلوسیتومتری و Real Time PCR انجام گردید. به یک پلیت هم به عنوان کنترل فقط وکتور اضافه شد. نتایج فلوسیتومتری توسط دستگاه Coulter EPICS XL (USA) اندازه‌گیری شد.

**استخراج RNA و ساخت cDNA**

RNA تمام با استفاده از محلول تریزول

درصد گزارش شده است (۱۰-۸). بنابراین بیان بیش از حد pgp به عنوان یک مکانیسم مقاومت دارویی در بدخیمی‌ها مانند بدخیمی‌های خونی یک شکل عمده‌ی درمانی است و برای مقابله با آن تا کنون از استراتژی‌های متفاوتی نظیر شیمی درمانی با دوز بالا و داروهای برعکس‌کننده‌ی مقاومت دارویی استفاده شده که نتایج آن رضایت بخش نبوده است (۱۵-۱۱).

استراتژی جدیدتر خاموش‌سازی ژن MDR1 بعد از نسخه‌برداری با استفاده از Antisense و Ribozyme در سال‌های اخیر استفاده از siRNA می‌باشد. همه‌ی این روش‌ها باعث تخریب mRNA ناشی از ژن MDR1 می‌شود؛ در نتیجه گلیکوپروتئین P به وجود نخواهد آمد و سلول نسبت به داروهای شیمی درمانی حساس می‌شود (۱۷-۱۶). از آن جایی که مقاومت دارویی یک مشکل عمده در درمان سرطان‌ها از جمله سرطان خون است، در این تحقیق تلاش شد تا با استفاده از siRNA و دو وکتور غیر ویروسی که در مقیاس نانومتر عمل می‌کنند باعث خاموش‌سازی ژن MDR1 و عدم بیان pgp در سلول‌های لوسمی حاد میلو بلاستیک مقاوم شویم و این سلول‌ها را نسبت به دارو حساس نماییم.

**روش‌ها****کشت سلول**

سلول اریترولوکمیا انسانی (K562) که پیشتر توسط داروی Doxorubicine مقاوم شده بود، از تانک ازت مایع خارج و بر طبق روش پیش گفته کشت داده شد (۱۸).

**فلوسیتومتری**

سلول‌های حساس و مقاوم بر اساس روش پیش گفته مورد فلوسیتومتری قرار گرفتند (۱۸).

*Real-time Q-RT-PCR*  
 Light cycler (Roche) در دستگاه Real-time PCR انجام شد. شرایط بهینه برای هر دو ژن MDR1 و GAPDH به صورت زیر به دست آمد: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه به عنوان مرحله‌ی واسرشت اولیه و به دنبال آن ۴۵ سیکل دمایی به شرح زیر: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۷۲ و ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه. واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر و با استفاده از ۲ میکرولیتر از cDNA، غلظت 1X از بافر PCR، 0.2mM، از هر کدام از (Roche, Germany) 5mM.dNTP از 0.2 mM، MgCl<sub>2</sub> از هر کدام از پرایمرها، 0.2 mM، Taqman DNA از 1.25U و SuperTaq polymerase انجام شد. آزمایش‌های RQ-PCR به صورت دوتایی (duplicate) انجام شد.

#### رسم منحنی استاندارد و آنالیز اطلاعات

منحنی استاندارد با به دست آوردن غلظت پلاسمید و تهیه رقت‌های سریالی از آن رسم گردید و برای Real Time PCR از آن استفاده شد. به منظور به حداقل رساندن تغییرپذیری در نتایج که می‌تواند به دلیل تفاوت در efficiency و RNA integrity در نمونه‌ها باشد تعداد کپی مطلق MDR1 با ژن کنترل GAPDH نرمالایز شد. نتیجه‌ی نهایی به صورت اندازه‌گیری کمی مطلق و محاسبه تعداد کپی در نمونه به دست آمد. آنالیز اطلاعات در دستگاه Light Cycler با نرم‌افزار Second Derivative Maximum Method که مخصوص این دستگاه است انجام شد. در این روش به طور خودکار تعداد سیکل Cross Point هر نمونه مشخص گردید. Cross point هر نمونه نقطه‌ای است که در آن سیکل وارد فاز لگاریتمی شده، اندازه‌گیری کمی نهایی در این نقطه با مقایسه‌ی Cross point‌های نمونه‌ها نسبت به منحنی استاندارد به دست می‌آید.

(Gibco –BRL, USA) از سلول‌ها استخراج و رسوب RNA در آب دیونیزه عاری از RNase حل شد. کیفیت RNA با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و مشاهده‌ی باندهای ۱۸S و ۲۸S ارزیابی شد. نسخه‌برداری معکوس (RT) با استفاده از ۱ میکروگرم از total RNA و آنزیم MMLV و هگزامرهای راندوم در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد.

#### طراحی آغازگرها برای کلونینگ

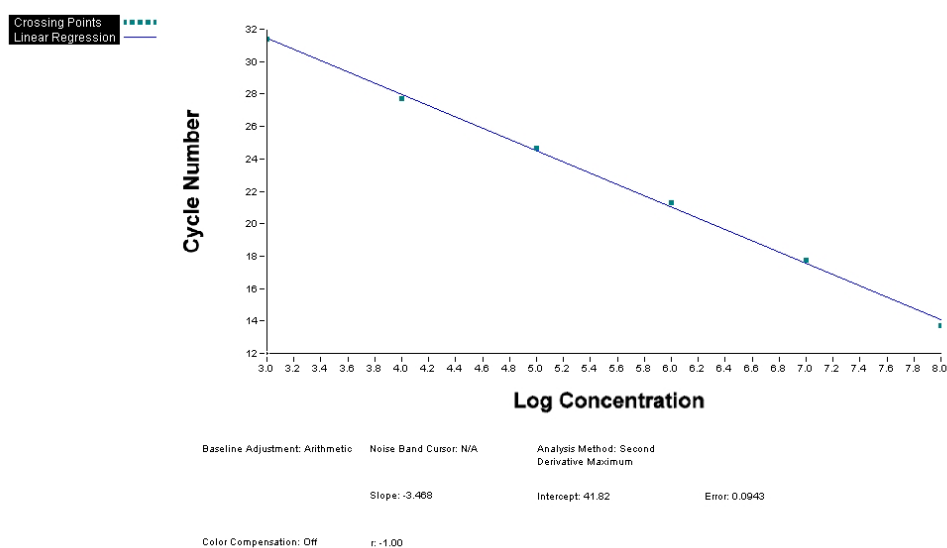
برای ژن‌های MDR1 و ژن مرجع GAPDH با glycerinaldehyde-3- phosphate (dehydrogenase) استفاده از توالی‌های منتشر شده در NCBI و با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شد. با استفاده از این پرایمرها قطعه‌ای از ژن MDR1 با طول ۱۰۲۵ bp و همین‌طور قطعه‌ای از ژن GAPDH با طول ۲۲۶ bp توسط PCR تکثیر شد. پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز باند مربوط به محصول PCR از ژل بریده و توسط کیت (Fermentas) از ژل تخلیص شد. هر دو محصول در وکتور مربوط به کیت T&A cloning (RBC, Taipei, Taiwan) کلون شدند. سپس پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Qiagen) تخلیص شد. در نهایت غلظت پلاسمید هم به روش اسپکتروفتومتری و هم به روش دانسیتومتری اندازه‌گیری گردید.

#### پرایمرها و پروب‌های Real-time PCR

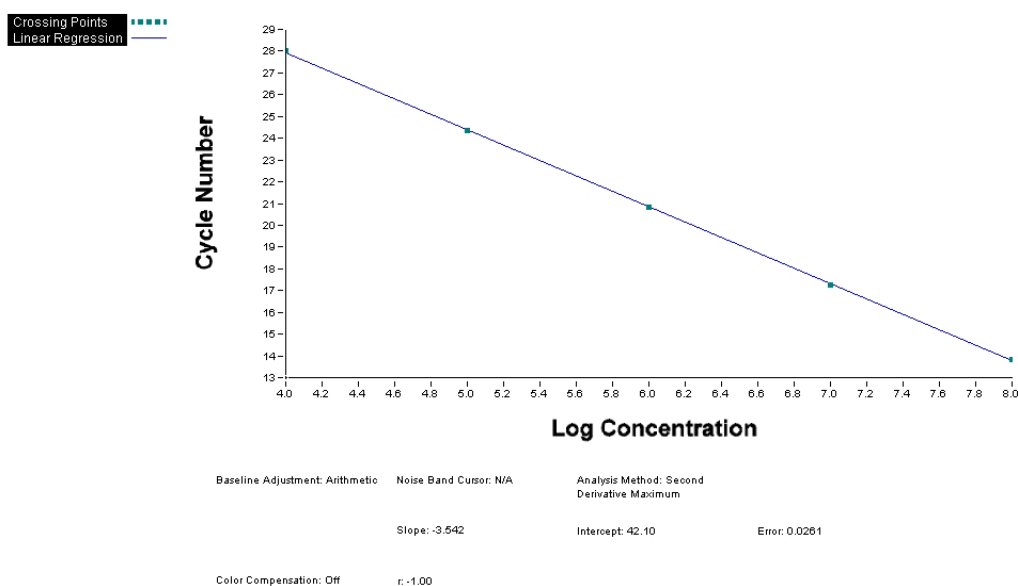
توالی پرایمرهای MDR1، GAPDH و پروب‌های Taqman مورد استفاده در RQ-PCR در جدول ۱ آورده شده است. پروب‌ها در انتهای 5' با -6-carboxy-fluorescein phosphoramidite (FAM) و در انتهای 3' با -5-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA) به عنوان Quencher نشان‌دار شدند.

جدول ۱. پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده

NAME	3' POSITION'5
MDR1-Forward	TTGGGGCTTTTAGTGTGGGA
MDR1-Reverse	CACAAGCCCAAGACAGAAAGC
GAPDH-Forward	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA
GAPDH-Reverse	GAAATCCCATCACCATCTTC
Real time-MDR1-Forward	AGGAAGCCAATGCCTATGACTTTA
Real time-MDR1-Reverse	GAGAGAGAGGGGCCAGTTG
MDR1-PROBE	GGCTGAGAACGGGAAGCTTG
GAPDH-PROBE	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC



نمودار ۱. منحنی استاندارد رسم شده با استفاده از سریال رقت پلاسمید حاوی ژن GAPDH



نمودار ۲. منحنی استاندارد رسم شده با استفاده از سریال رقت پلاسمید حاوی ژن MDR1

## یافته‌ها

سلول حساس و مقاوم K562 بدون تأثیر siRNA از نظر بیان گلیکوپروتئین P مورد فلوسیتومتری قرار گرفت. سپس سلول مقاوم توسط siRNA در کمپلکس با دو وکتور غیر ویروسی به نام‌های PEI و Fugene 6 تیمار شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون از نظر بیان گلیکوپروتئین P فلوسیتومتری شد و کاهش بیان گلیکوپروتئین P در اثر siRNA مشاهده گردید که در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. درصد گلیکوپروتئین P قبل و بعد از درمان با siRNA

توسط دو وکتور غیر ویروسی		
نوع نمونه	کنترل منفی (%)	تست (%)
سلول مقاوم	۲	۴۲
سلول حساس	۲	۶
سلول مقاوم تیمار شده با siRNA و Fugene 6	۲	۹/۸
سلول مقاوم تیمار شده با siRNA و PEI	۲	۶/۳

درصد بیان گلیکوپروتئین در اثر درمان با PEI و siRNA از ۴۲ درصد به ۶/۳ درصد رسیده و ۹۰ درصد کاهش بیان داشته است؛ اختلاف این دو با  $P = ۰/۱۵۳$  معنی‌دار نبود. نمودارهای حاصل از فلوسیتومتری سلول‌ها در شکل ۱ آمده است.

همچنین سلول‌های مقاوم و حساس و درمان شده توسط روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است.

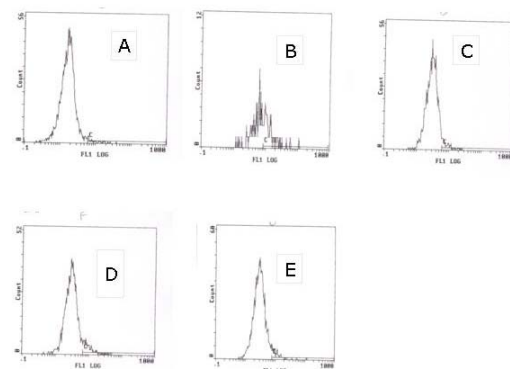
جدول ۳. نتایج حاصل از روش Real Time PCR

نوع نمونه	MDR1	GAPDH	تعداد کپی
سلول مقاوم	$۲/۲ \times ۱۰^۴$	$۱ \times ۱۰^۷$	۲۲۰۰
سلول حساس	۰	$۱ \times ۱۰^۷$	۰
سلول مقاوم تیمار شده با siRNA و Fugene	$۱/۷ \times ۱۰^۴$	$۲ \times ۱۰^۷$	۸۵۰
سلول مقاوم تیمار شده با siRNA و PEI	$۹/۲ \times ۱۰^۳$	$۱/۶ \times ۱۰^۷$	۵۷۰

همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده شده است در سلول حساس بیان ژن MDR1 برابر با صفر و تعداد کپی ژن MDR1 در سلول مقاوم برابر با  $۲/۲ \times ۱۰^۴$  می‌باشد و در اثر درمان با siRNA و Fugene به ۸۵۰ کپی رسیده و در حدود ۶۵ درصد کاهش داشته است. همچنین در اثر درمان با PEI و siRNA تعداد کپی ژن به ۵۷۰ رسیده و در حدود ۷۵ درصد کاهش داشته است و اختلاف این دو با  $P < ۰/۱۵۳$  معنی‌دار نبوده است.

## بحث

مقاومت دارویی یکی از مشکلات اصلی در درمان سرطان‌ها از جمله سرطان حاد میلو بلاستیک خون می‌باشد و استراتژی‌های مختلف درمانی نظیر شیمی‌درمانی با دوز بالا و استفاده از داروهای بر عکس‌کننده تا کنون موفقیت‌آمیز نبوده است و



شکل ۱. نتایج فلوسیتومتری گلیکو پروتئین P.

A: کنترل منفی (۲٪); B: سلول مقاوم KDI/20 (۴۲٪); C: سلول حساس (۶٪); D: سلول مقاوم به همراه siRNA و وکتور Fugene 6 (۹/۸٪); E: سلول مقاوم به همراه siRNA و وکتور PEI (۶/۳٪).

همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است درصد بیان گلیکوپروتئین P در اثر درمان با Fugene 6 و siRNA از ۴۲ درصد به ۹/۸ درصد رسیده و ۸۰ درصد کاهش داشته است. این در حالی است که

ژن MDR1 در سلول‌های سرطان خون حاد مقاوم به آدریامایسین استفاده کردند و موفق شدند بیان ژن را تا ۸۵ درصد توسط روش الکتروپوزیشن و ۵۲ درصد با استفاده از وکتورهای لیپیدی کاهش دهند (۳۰).

همان گونه که در بالا ذکر شد محققین مختلف در سال‌های متوالی با استفاده از siRNA بر ضد ژن MDR1 توانسته‌اند بیان این ژن را در انواع سلول‌های مختلف سرطانی مقاوم به دارو کاهش دهند. در تحقیق‌های حاضر نیز ما توانستیم با استفاده از siRNA ضد ژن MDR1 و استفاده از یک وکتور لیپیدی و یک وکتور شیمیایی (PEI) که در مقیاس نانومتر عمل می‌کنند به ترتیب ۶۵٪ و ۷۵٪ بیان ژن MDR1 را کاهش دهیم (جدول ۳). همچنین این کاهش در محصول بیان ژن یعنی گلیکوپروتئین P به ترتیب به میزان ۸۰ درصد با وکتور لیپیدی و ۹۰ درصد با وکتور شیمیایی دیده شده است (جدول ۲ و شکل ۱). ولی همان گونه که در نتایج ذکر شد تفاوت این اختلاف، معنی‌دار نبوده است و دو وکتور به یک میزان توانسته‌اند siRNA را به داخل سلول هدایت و باعث کاهش بیان ژن MDR1 شوند که نتایج ما نیز مشابه به نتایج محققان دیگری است که پیشتر ذکر شد و امید می‌رود که در آینده از این روش بتوان در *in vivo* جهت موارد خاموش‌سازی ژن بعد از نسخه‌برداری نظیر خاموش‌سازی ژن مقاومت دارویی چندگانه یا MDR1 استفاده و سلول‌های بیمار را نسبت به داروهای شیمی درمانی حساس نمود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با شماره‌ی طرح ۲۹۰۲ در مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی و پیوند مغز

محققان در سال‌های اخیر از روش‌های خاموش‌سازی ژن توسط siRNA استفاده نموده‌اند.

مکانیسم خاموش‌سازی ژن توسط siRNA در سال ۱۹۹۸ توسط Fire و همکاران در نماتودها شناخته شد (۱۹) و در سال ۲۰۰۱ در پستانداران به کار رفت (۲۰). از siRNA در حال حاضر در تحقیقات زیادی بر علیه ژن‌های مختلف به ویژه ژن‌های درگیر در سرطان استفاده می‌شود (۲۴-۲۱).

به نظر می‌رسد استرس‌های فیزیکی از طریق ترشح آدرنالین و تحریک‌های آدرنرژیک باعث بیان بیش از حد MDR1 و ایجاد مقاومت دارویی در سرطان سینه می‌شود و این مقاومت را می‌توان به وسیله‌ی siRNA علیه ژن مقاومت دارویی مهار کرد (۲۵). Jun و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از سلول سارکومی رحم انسانی و siRNA ضد ژن مقاومت دارویی (MDR1) کاهش بیان این ژن و گلیکوپروتئین P را به روش RTPCR کمی نشان داده است (۲۶).

Lin و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از siRNA توانسته‌اند بیان ژن MDR1 را در رده‌ی سلولی سرطان سینه (MCF-7/R) تا ۵۰ درصد کاهش دهند (۲۷).

از siRNA علیه ژن مقاومت دارویی در سال ۲۰۰۷ توسط Sichuan و همکاران در سلول‌های سرطان تخمدان استفاده شده، کاهش قابل توجه بیان ژن MDR1 را ملاحظه کرده‌اند (۲۸)، همچنین GU و همکاران سال ۲۰۰۷ از siRNA علیه ژن مقاومت دارویی MDR1 در سلول‌های K562 انسانی مقاوم به آدریامایسین استفاده و مهار کامل مقاومت دارویی را در این سلول‌ها مشاهده کردند (۲۹).

در سال ۲۰۰۷، Lim و همکاران از siRNA علیه



مرکز تحقیقات خون و انکولوژی و پیوند مغز استخوان به ویژه مسئولین محترم آن صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

استخوان دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسیده و کلیه‌ی هزینه‌های آن توسط آن مرکز تأمین شده است. بدین وسیله از زحمات کلیه‌ی همکاران

## References

1. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams hematology. 6<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2000. p. 1045, 1083.
2. Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wormann B, et al. Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol* 1999; 17(11): 3569-76.
3. Jackson GH. Use of fludarabine in the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematol J* 2004; 5(Suppl 1): S62-S67.
4. Schaich M, Ritter M, Illmer T, Lisske P, Thiede C, Schakel U, et al. Mutations in ras proto-oncogenes are associated with lower mdr1 gene expression in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 112(2): 300-7.
5. Simon SM, Schindler M. Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(9): 3497-504.
6. Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* 1990; 265(1): 506-14.
7. Higgins CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 1992; 17(1): 18-21.
8. Hunault M, Zhou D, Delmer A, Ramond S, Viguie F, Cadiou M, et al. Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia: major prognosis significance for in vivo drug resistance to induction treatment. *Ann Hematol* 1997; 74(2): 65-71.
9. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87(5): 1997-2004.
10. Nussler V, Pelka-Fleischer R, Zwierzina H, Nerl C, Beckert B, Gieseler F, et al. P-glycoprotein expression in patients with acute leukemia-clinical relevance. *Leukemia* 1996; 10(Suppl 3): S23-S31.
11. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14(3): 467-73.
12. Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, et al. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(18): 7160-4.
13. Ludescher C, Thaler J, Drach D, Drach J, Spitaler M, Gatringer C, et al. Detection of activity of P-glycoprotein in human tumour samples using rhodamine 123. *Br J Haematol* 1992; 82(1): 161-8.
14. Shiraki N, Hamada A, Ohmura T, Tokunaga J, Oyama N, Nakano M. Increase in doxorubicin cytotoxicity by inhibition of P-glycoprotein activity with lomerizine. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(5): 555-7.
15. Li X, Smyth AP, Barrett DJ, Ivy SP, von Hofe E. Sensitization of multidrug-resistant human leukemia cells with MDR1-targeted antisense and inhibition of drug-mediated MDR1 induction. *Leukemia* 1997; 11(7): 950-7.
16. Yague E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther* 2004; 11(14): 1170-4.
17. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and



- 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15(2): 188-200.
18. Nadali F, Pourfathollah AA, Alimoghaddam K, Nikougoftar M, Rostami S, Dizaji A, et al. Multidrug resistance inhibition by antisense oligonucleotide against MDR1/mRNA in P-glycoprotein expressing leukemic cells. *Hematology* 2007; 12(5): 393-401.
19. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.
20. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836): 494-8.
21. Heidersbach A, Gaspar-Maia A, McManus MT, Ramalho-Santos M. RNA interference in embryonic stem cells and the prospects for future therapies. *Gene Ther* 2006; 13(6): 478-86.
22. Dykxhoorn DM, Palliser D, Lieberman J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther* 2006; 13(6): 541-52.
23. Cullen BR. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther* 2006; 13(6): 503-8.
24. Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* 2006; 13(6): 464-77.
25. Su F, Ouyang N, Zhu P, Ouyang N, Jia W, Gong C, et al. Psychological stress induces chemoresistance in breast cancer by upregulating *mdr1*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329(3): 888-97.
26. Jun H, Mutch DG, Herzog TJ. Stable suppression of MDR-1 gene using siRNA expression vector to reverse drug resistance in a human uterine sarcoma cell line. *Gynecologic oncology* 2005; 98(1): 31-8.
27. Li L, Xu J, Min T, Huang W. Reversal of MDR1 gene-dependent multidrug resistance using low concentration of endonuclease-prepared small interference RNA. *Eur J Pharmacol* 2006; 536(1-2): 93-7.
28. Lou JY, Peng ZL, Zheng Y, Wang H, He B, Wang HJ. Research on human ovarian cancer cell MDR1 gene silenced by siRNA. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 38(5): 753-5.
29. Gu L, Liu T, Gong YP, Xi YM. [Study on RNA interference reversing the multidrug resistance of leukemia cell]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 38(1): 45-8.
30. Lim MN, Lau NS, Chang KM, Leong CF, Zakaria Z. Modulating multidrug resistance gene in leukaemia cells by short interfering RNA. *Singapore Med J* 2007; 48(10): 932-8.

Received: 17.5.2008

Accepted: 7.9.2008

**The Suppression of Multidrug Resistance in Leukemic Cells by Short Interfering RNA**Fatemeh Nadali MD<sup>\*</sup>, Kamran Alimoghaddam MD<sup>\*\*</sup>, Shahrbanoo Rostami MD<sup>\*\*\*</sup>, Hamidolah Ghafari MD<sup>\*\*\*\*</sup>, Ardeshir Ghavamzadeh MD<sup>\*\*\*\*\*</sup><sup>\*</sup> Assistant Professor of Hematology, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.<sup>\*\*</sup> Associated Professor of Hematology, Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.<sup>\*\*\*</sup> Ph.D Student of Hematology, Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.<sup>\*\*\*\*</sup> Assistant Professor of Genetic, Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.<sup>\*\*\*\*\*</sup> Professor of Hematology-Oncology, Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.**Background:****Abstract**

Acute myeloblastic leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia in adults. One of the major problems in this disease is the emergence of leukemic blast cells that are resistant to anticancer drugs. This phenomenon is termed multidrug resistance (MDR). One cause of the MDR is the expression of the *MDR1* gene and its product, P-glycoprotein (Pgp). In this study, we tried to inhibit the MDR phenotype with MDR1/mRNA/Pgp in the leukemic cells using short interfering RNA (siRNA) and two nano particles as non-viral vectors.

**Methods:**

The Pgp expressing cell line was established from a parental K562 cell line with increasing concentration of doxorubicin and named KDI/20. In order to reverse the MDR phenotype due to pgp expression, siRNA against MDR1/mRNA was synthesized. siRNA was used on the KDI/20 cells in combination with two nano particles as non-viral vectors: (1) Fugene 6 transfection reagent (cationic lipid) and (2) polyethylenimine (cationic polymer). The effect of these complexes was assessed at the cellular level by flowcytometry (for Pgp detection) and molecular level by Real Time - PCR.

**Findings:**

The result showed 79% reduction in Pgp by siRNA /Fugene 6 and 86% reduction in the Pgp by siRNA/PEI at the cellular level in flowcytometry. Also 62% reduction in the MDR1/mRNA by siRNA /Fugene 6 and 74% reduction in the MDR1/mRNA by siRNA /PEI at the molecular level by Real Time - PCR.

**Conclusion:**

siRNA could be an efficient method in order to post transcriptional gene silencing and there were no significant differences between two nano particles in gene silencing in this study.

**Key words:**

siRNA, MDR1 gene, P-glycoprotein, Multidrug Resistance.

**Page count:**

10

**Tables:**

4

**Figures:**

3

**References:**

30

**Address of Correspondence:**

Fatemeh Nadali, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

E-mail: nadali@med.mui.ac.ir