

بررسی اثر آگونیسست و آنتاگونیست گیرنده‌ی آدنوزین نوع A1 بر بیان ژن و P53 مسیرها و میزان آپوپتوز در گلیوبلاستوما‌ی چند شکلی U87Mg

فهیمة زمانی رارانی^۱، زین‌العابدین شریفیان دستجردی^۲، علی‌والیانی^۳، محمد زمانی رارانی^۴، الیاس کارگر ابرقویی^۵، ابراهیم افتخار^۶، مجید پورانتظاری^۷، جواد مهاجر انصاری^۸

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پیش‌آگهی نامناسب در سرطان‌های مغزی نیاز به روش‌های جدید درمانی را می‌طلبد. به کارگیری خانواده‌ی گیرنده‌های پورینرژیک با اثرات آپوپتوزی تأیید شده، می‌تواند مفید باشد. با توجه به این که نقش گیرنده‌ی نوع A1 در گلیوبلاستوما‌ی مولتی فرم در رابطه با ژن P53 و مسیروهای آپوپتوزی گزارش نشده است، در این مطالعه نقش آگونیسست (N6-Cyclopentyladenosine یا CPA) و آنتاگونیست (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine یا DPCPX) این گیرنده بر آپوپتوز سلولی و نیز بیان ژن‌های P53 و کاسپازهای ۷، ۸ و ۹ مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه، برای بررسی میزان ازدیاد سلولی از روش MTT و نیز جهت بررسی آپوپتوز در مراحل اولیه و ثانویه سلولی از روش فلوسایتومتری با Annexin و Pi استفاده شد. برای بررسی مسیروهای داخلی و خارجی آپوپتوز، میزان بیان ژن‌های P53 و کاسپازهای ۷، ۸ و ۹ توسط Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real time RT PCR) سنجیده شد.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های U87Mg با DPCPX باعث افزایش بیان ژن P53 می‌شود. بیان کاسپاز ۷ به عنوان یک کاسپاز اجرایی و کاسپاز ۹ به عنوان کاسپاز مسیر میتوکندریایی آپوپتوز افزایش یافت، اما تغییر بیانی در ژن کاسپاز ۸ دیده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج MTT و فلوسایتومتری نشان داد که DPCPX علاوه بر سرکوب تکثیر سلولی باعث تحریک آپوپتوز در سلول‌های U87Mg می‌شود. سرکوب گیرنده‌های آدنوزین A1 با تحریک بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوزی به خصوص ژن‌های مسیر میتوکندریایی باعث سرکوب تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های U87Mg می‌شود.

واژگان کلیدی: گیرنده؛ آدنوزین؛ A1 آپوپتوز؛ ژن‌های P53

ارجاع: زمانی رارانی فهیمة، شریفیان دستجردی زین‌العابدین، والیانی علی، زمانی رارانی محمد، کارگر ابرقویی الیاس، افتخار ابراهیم، پورانتظاری مجید، مهاجر انصاری جواد. **بررسی اثر آگونیسست و آنتاگونیست گیرنده‌ی آدنوزین نوع A1 بر بیان ژن P53 و مسیرها و میزان آپوپتوز در گلیوبلاستوما‌ی چند شکلی U87Mg.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۶۰۱): ۸۸۱-۸۷۵.

مهمی داشته است (۲). یکی از این گیرنده‌ها، خانواده‌ی گیرنده‌های پورینرژیک با ۴ عضو A1، A2a، A2b و A3 می‌باشد که بیان آن‌ها در سیستم گوارش، عصبی مرکزی و اوروژنیتال تأیید و مطالعاتی درباره‌ی نقش آن‌ها در تومورهای مختلف انجام شده است (۳).

مقدمه

درمان سرطان توسط مهار یا تحریک گیرنده‌های سلولی از راهبردهایی است که می‌تواند همراه روش‌های موجود بازدهی درمان را افزایش دهد (۱). شناخت گیرنده‌های سلولی در توسعه‌ی این مطالعات نقش

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
 - ۲- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - ۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
 - ۴- دانشیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، مرکز سلامت هرمزگان، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.
 - ۵- استادیار، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
- نویسنده‌ی مسؤول: محمد زمانی رارانی؛ استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، هرمزگان، ایران

Email: mohammad.zamani@hums.ac.ir

۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر، استرپتوما‌سیسین ۱۰۰ گرم/میلی‌لیتر و در انکوباتور با دی‌اکسید کربن ۵ درصد، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض و پس از رسیدن به اشباع (Confluency) ۸۵ درصد پاساژ داده شد.

اندازه‌گیری IC50 آگونیست و آنتاگونیست: برای محاسبه‌ی دز قابل استفاده‌ی آگونیست (CPA) و آنتاگونیست (DPCPX) از روش Half maximal inhibitory concentration (IC50) استفاده شد. در این روش، ۱۰۴ سلول کاشته شد و سپس CPA با دزهای ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار و DPCPX با دزهای ۱، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار و ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار به محیط کشت اضافه شد. محیط کشت تخلیه و با روش MTT درصد سلول‌های زنده در هر گروه مشخص شد. سلول‌های زنده MTT را جذب و به کریستال‌های فرمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کنند. در نهایت، این کریستال‌ها در Dimethyl sulfoxide (DMSO) حل شد و جذب نوری آن اندازه‌گیری گردید. نمودار درصد سلول‌های زنده در مقابل دزهای مورد استفاده به منظور محاسبه‌ی IC50 استفاده شد.

آزمایش MTT در این روش، ابتدا ۱۰۴ سلول در پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد. CPA و DPCPX طبق IC50 به هر پلیت اضافه شد. پس از گذشت زمان تعیین شده، محیط کشت تخلیه و محلول MTT اضافه شد. با گذشت ۴ ساعت با تجزیه کردن سلول توسط DMSO، شدت رنگ محلول با دستگاه Plate reader مشخص شد. این شدت رنگ، با درصد سلول‌های زنده رابطه‌ی مستقیم دارد. این روش برای تمامی گروه‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

روش فلورسایتمتری: میزان آپوپتوز سلولی با استفاده از کیت Annexin V FLUOS (Roche, 11988549001) بررسی شد. پس از کشت ۵ × ۱۰۵ سلول در فلاسک T25، دز CPA و DPCPX بر اساس IC50 اضافه و پس از گذشت زمان تیمار، سلول‌ها مطابق دستورالعمل سازنده‌ی کیت با Annexin و PI تیمار شد و در نهایت به دستگاه منتقل گردید و میزان آپوپتوز در مراحل ابتدایی و پیشرفته مورد سنجش قرار گرفت. این تست برای تمامی گروه‌ها در ۳ بار تکرار انجام شد.

Real time reverse transcription polymerase chain reaction

(Real time RT PCR): میزان بیان ژن P53 و ژن‌های کاسپازی ۷، ۸ و ۹ توسط پرایمرهای اختصاصی هر ژن سنجیده شد. پس از کشت ۵ × ۱۰۵ سلول در فلاسک T25، دز CPA و DPCPX بر اساس IC50 اضافه و پس از گذشت زمان تیمار، RNA سلول‌ها توسط کیت Total RNA extraction mini kit (FABRK001, Favorgen Biotech) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و توسط کیت First strand-strand cDNA synthesis

تحریک یا مهار هر یک از اعضای این خانواده، اثرات متفاوت و حتی متضادی در تکثیر یا آپوپتوز سلولی دارد و بسته به نوع بافت و سلولی که گیرنده در آن بیان می‌شود، متفاوت بوده است (۴-۵). در این مطالعه، از N6-Cyclopentyladenosine (CPA) به عنوان آگونیست گیرنده‌ی A1 و نیز از 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌ی A1 استفاده شد.

آپوپتوز با تغییرات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی مشخص می‌شود. مطالعات دو مسیر پیام‌رسانی شامل مسیر خارجی با واسطه‌ی گیرنده‌های مرگ سطح سلول و مسیر داخلی به واسطه‌ی آزاد شدن سیتوکروم C میتوکندری را مشخص کرده‌اند. در مسیر خارجی، اتصال لیگاند به گیرنده باعث فعال شدن کاسپاز ۸ می‌شود و در مسیر داخلی، کاسپاز ۹ فعال می‌شود و در نهایت، هر دو مسیر باعث فعال شدن کاسپازهای اجرایی ۳، ۶ و ۷ می‌گردند که باعث القای آپوپتوز می‌شوند (۶).

P53 یک عامل رونویسی سرکوب کننده‌ی توموری، در ۵۰ درصد از تومورهای انسانی جهش یافته است. افزایش بیان و غلظت آن، باعث توقف تکثیر سلولی و تحریک آپوپتوز می‌شود (۷-۸). این ژن و بازگرداندن عملکرد آن هدف بسیاری از مطالعات ضد سرطانی جدید بوده است (۹، ۷).

در بیشتر سرطان‌های مغزی، نتایج درمان و پیش‌آگهی مناسب نیست و نیاز به روش‌هایی با کارایی بیشتر به وضوح احساس می‌شود (۱۰). گلیوبلاستوما‌ی چند شکلی (Multiform)، شایع‌ترین تومور مغزی اولیه و دارای سلول‌هایی مقاوم نسبت به درمان‌های موجود است و در رده‌بندی سازمان بهداشت جهانی در درجه‌ی ۴ قرار می‌گیرد و باعث مرگ درصد زیادی از مبتلایان می‌شود (۱۱-۱۲).

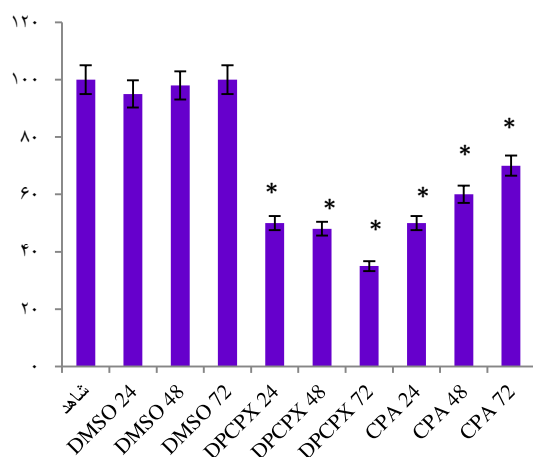
با توجه به این که نقش تحریک و مهار گیرنده‌ی آدنوزین نوع A1 در گلیوبلاستوما‌ی چندشکلی مورد مطالعه قرار نگرفته و ارتباط آن با بیان ژن P53، ژن‌های مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز و نیز میزان تکثیر و بقای سلولی گزارش نشده بود، این مطالعه با هدف بررسی نقش آگونیست و آنتاگونیست اختصاصی این گیرنده در بیان ژن‌های پیش‌گفته و تغییر میزان بقا و آپوپتوز سلولی و همچنین، ژن‌های دخیل در آپوپتوز انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان در سال‌های ۹۹-۱۳۹۸ انجام شد.

رده‌ی سلولی و شرایط کشت: سلول‌های گلیوبلاستوما‌ی انسانی (U87MG) از انستیتو پاستور خریداری و در محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, Germany)، پنی‌سیلین

یافته‌های MTT تأثیر CPA و DPCPX بر تزیاید سلولی با روش MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده‌ی سلولی U87MG سنجیده شد. طبق نتایج، CPA باعث افزایش تزیاید سلولی شد؛ در حالی که DPCPX، باعث سرکوب شدید تزیاید سلولی به خصوص پس از ۷۲ ساعت از تیمار شد (شکل ۲).



نتایج روش MTT

شکل ۲. نتایج روش MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌های U87MG با N6-Cyclopentyladenosine (CPA) و 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) با غلظت Half maximal inhibitory concentration (IC50). DPCPX باعث سرکوب تزیاید سلولی در سلول‌های U87MG به خصوص در زمان ۷۲ ساعت بعد از تیمار می‌شود ($P < 0.05$)

یافته‌های فلوسایتومتری: بررسی میزان آپوپتوز در نتیجه‌ی تیمار سلول‌های U87MG با آگونیست و آنتاگونیست توسط کیت Annexin V-FITC انجام شد. نتایج نشان داد که پس از تیمار با CPA در ۲۴ ساعت، میزان آپوپتوز اندکی افزایش یافت؛ اما در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، تغییر معنی‌داری دیده نشد. همچنین، DPCPX باعث افزایش معنی‌داری در میزان آپوپتوز سلول‌های U87MG به خصوص پس از ۷۲ ساعت از تیمار شد (شکل ۳).

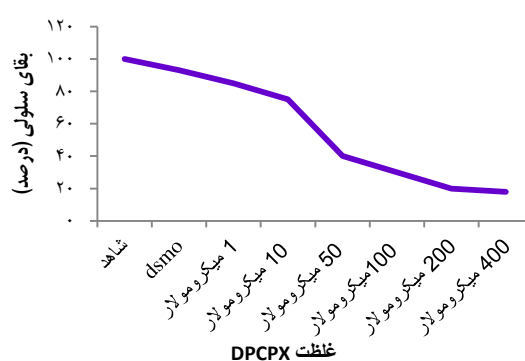
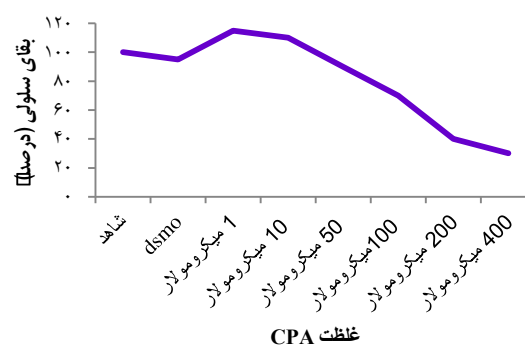
یافته‌های Real time RT PCR اثر CPA و DPCPX بر بیان ژن‌های P53 و کاسپازهای ۷، ۸، ۹ در رده‌ی سلولی U87MG با روش Real time RT PCR بررسی شد. تیمار سلول‌ها با DPCPX باعث افزایش بیان ژن‌های P53 و کاسپاز ۷ و ۹ به خصوص در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار شد، اما تغییر معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۸ دیده نشد ($P < 0.05$). CPA تغییر معنی‌داری در بیان این ژن‌ها ایجاد نکرد ($P < 0.05$) (شکل ۴).

(YT4500, YTA) سنتز complementary DNA (cdNA) انجام شد. در نهایت، میزان بیان ژن‌های مورد نظر توسط پرایمر اختصاصی و با کیت SYBR Green qPCR mastermix (YT2551, YTA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده توسط دستگاه SENSE صورت گرفت.

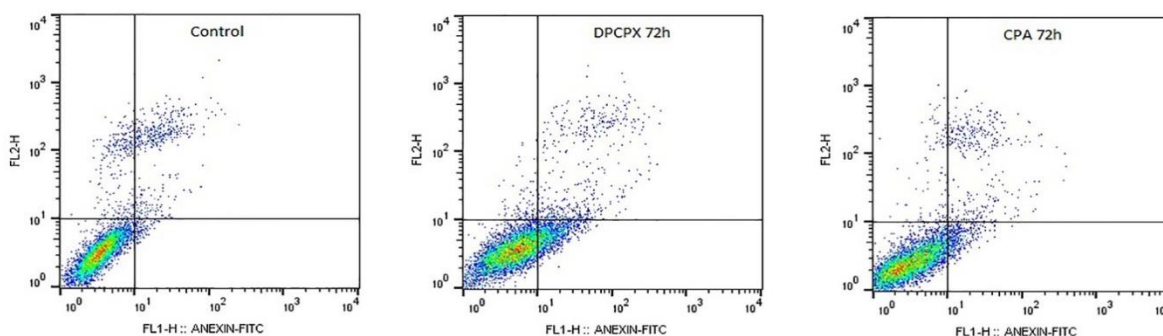
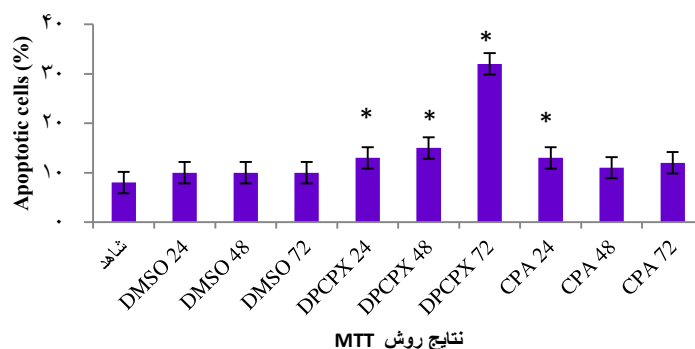
محاسبات آماری و تحلیل داده‌ها: محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (IBM Corporation, Armonk, NY) و آزمون One-way ANOVA انجام گردید. آزمایش‌ها به صورت تکرارهای سه‌تایی در هر گروه انجام گردید. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های IC50: در این روش از CPA و DPCPX به مدت ۲۴ ساعت برای تیمار سلول‌های U87MG استفاده شد. IC50 محاسبه شده CPA ۱۷۰ میکرومولار و برای DPCPX ۸۵ نانومولار برای سلول‌های U87MG بود (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج آزمایش Half maximal inhibitory concentration (IC50) برای N6-Cyclopentyladenosine (CPA) و 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX). CPA با غلظت ۱۷۰ میکرومولار و DPCPX با غلظت ۸۵ نانومولار در ۲۴ ساعت باعث مرگ ۵۰ درصد سلول‌های مورد مطالعه شد.

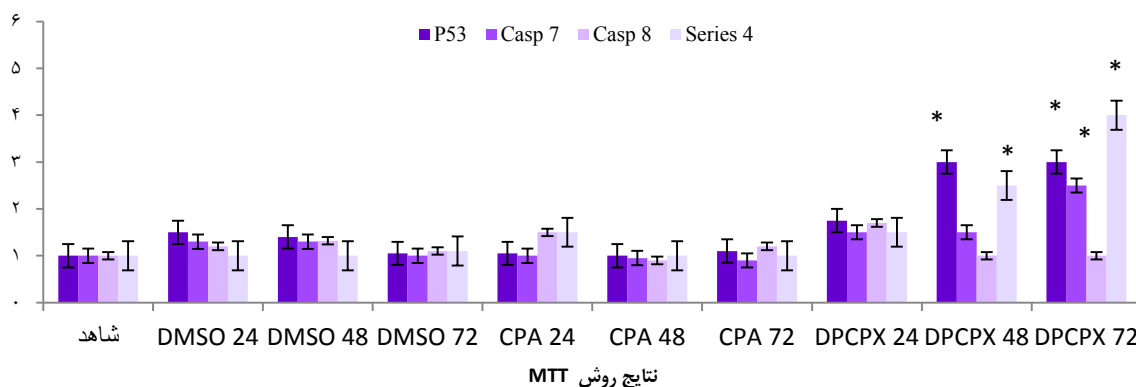


شکل ۳. نتایج روش فلوسایتومتری با Annexin-v FITC و PI Propidium iodide (PI) بعد از تیمار با (CPA) N6-Cyclopentyladenosine و (DPCPX) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت (IC50) Half maximal inhibitory concentration. DPCPX باعث افزایش معنی‌دار آپوپتوز در سلول‌های U87Mg به ویژه ۷۲ ساعت بعد از تیمار می‌شود ($P < 0/050$). CPA تأثیر معنی‌داری بر این سلول‌ها در زمان‌های مورد مطالعه نداشت ($P < 0/050$).

شکل با شاخص تزیاید بالا است که در مقابل، بسیاری از داروهای ضد سرطان مقاومت نشان می‌دهند (۱۳-۱۴). استفاده از ویژگی‌های خاص این سلول‌ها مانند گیرنده‌های سطحی و هدف قرار دادن مسیرهای پیام‌رسانی سلولی، می‌تواند راه‌کاری در بهبود بازدهی درمان باشد (۱۱).

بحث

گلیوبلاستوما‌ی چندشکلی (Multiform)، شایع‌ترین بدخیمی اولیه‌ی سلول‌های مغزی است که هنوز پیش‌آگهی خوبی ندارد و بیشتر بیماران طی یک سال از زمان تشخیص، جان خود را از دست می‌دهند (۱۳-۱۴). این بدخیمی شامل سلول‌هایی با هسته‌های چند



شکل ۴. اثر (CPA) N6-Cyclopentyladenosine و (DPCPX) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine بر سطح بیان P53 و کاسپازهای ۷، ۸ و ۹. DPCPX باعث افزایش بیان P53 و کاسپازهای ۷ و ۹ شد؛ در حالی که بر بیان کاسپاز ۸ اثر معنی‌داری نداشت ($P < 0/050$). تیمار با CPA تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه نداشت ($P < 0/050$).

NFKB و تولید سایتوکاین‌ها دارند، فعالیت آن حفظ و در فرایندهایی مانند آنژیوژنز و مقاومت نسبت به شیمی درمانی شرکت می‌کند (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر، مشخص شد که تحریک گیرنده‌ی A1 توسط CPA باعث افزایش آپوپتوز سلولی و سرکوب تکثیر سلول‌های گلیوبلاستوما می‌شود (شکل ۳-۲). DPCPX اثرات متضادی نشان داد. مطالعات نشان داده است که نقش این گیرنده در سلول‌های مختلف، می‌تواند متضاد باشد. آدنوزین خارج سلولی، باعث تحریک آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلون CW2 به وسیله‌ی فعال‌سازی کاسپازهای مسیر داخلی و خارجی می‌شود. ۲-کلروآدنوزین، به عنوان آگونیست گیرنده‌ی A1 و MDL-12330A به عنوان مهار کننده‌ی آدنیلات سیکلاز هم اثرات مشابه آدنوزین خارج سلولی بر سلول‌های CW2 دارند (۲۵).

در سرطان پستان، گیرنده‌ی A1 باعث افزایش فعالیت گیرنده‌ی استروژن آلفا می‌شود. استرادیول به عنوان لیگاند این گیرنده، باعث افزایش سطح Messenger RNA (mRNA) این گیرنده می‌شود و این چرخه، باعث افزایش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد. DPCPX باعث کاهش بیان گیرنده‌ی استروژنی آلفا و کاهش سطح پروتئینی آن می‌شود و با اختلال در مسیر پیام‌رسانی آن از تکثیر سلول‌های سرطانی می‌کاهد و آپوپتوز را تحریک می‌کند (۲۶).

نتیجه‌گیری

آدنوزین خارج سلولی، باعث القای آپوپتوز در سرطان معده می‌شود. آدنوزین با ورود به سلول می‌تواند آپوپتوز مستقل از کاسپازها را به واسطه‌ی پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMP-activated protein kinase یا AMPK) یا آپوپتوز وابسته به کاسپازها را با اتصال به گیرنده‌های آدنوزین القا کند (۲۷). این یافته‌ها، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر در زمینه‌ی گلیوبلاستوما تضاد است و احتمال می‌رود مشخصات ژنی هر سلول، باعث این تفاوت رفتاری نسبت به آگونیست و آنتاگونیست A1 می‌شود. این مطلب، نیاز به مطالعات دقیق در هر نوع سلول سرطانی را نشان می‌دهد. در مجموع، با توجه به مطالعه‌ی حاضر و مطالعات اخیر، به نظر می‌رسد می‌توان با تحریک و یا مهار این گیرنده، به راهکارهای جدیدی در بهبود فرایند کنترل سلول‌های سرطانی دست یافت.

تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۹۸۰۰۶۳ و با کد اخلاق IR.HUMS.REC.1399.016 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان می‌باشد. بدین وسیله، از زحمات و حمایت‌های مادی و معنوی این عزیزان سپاسگزاری می‌گردد.

مطالعات نشان داده است که گیرنده‌های آدنوزین نوع A1، A2a، A2b و همگی در سلول‌های گلیوبلاستوما بیان می‌شوند. بیان آن‌ها در سلول‌های شبه بنیادی گلیوبلاستوما بیشتر است (۱۶-۱۵). بر اساس این یافته‌ها، در این مطالعه، نقش آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌ی آدنوزین نوع A1 بر تریاید و آپوپتوز سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که DPCPX باعث سرکوب تریاید سلولی و تحریک آپوپتوز در سلول‌های گلیوبلاستوما می‌شود (شکل‌های ۳-۲)، اما گزارش شده است که فعال کردن گیرنده‌ی A1 و A2a در سلول‌های شبه بنیادی سرطانی گلیوبلاستوما، باعث حساس شدن آن‌ها به داروهای شیمی درمانی می‌شود و تحریک گیرنده‌ی A1، توانایی تمایزی به سمت سلول‌های گلیال را نیز افزایش می‌دهد. فسفوریلاسیون ERK/AKT و بیان عوامل تحریک شونده با هیپوکسی، کاهش در تریاید سلولی و افزایش آپوپتوز در نتیجه‌ی تحریک این گیرنده‌ها دیده شده است (۱۷). این یافته‌ها، با نتایج مطالعه‌ی زیر در تضاد است. بیان شده است که سلول‌های شبه بنیادی در توده‌ی سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما با ترشح آدنوزین حتی در شرایط هیپوکسی باعث تحریک سلول‌های سرطانی مجاور و تهاجم و متاستاز آن‌ها می‌شوند. استفاده از آدنوزین دامیناز با تجزیه‌ی آدنوزین خارج سلولی در محیط اطراف تومور، باعث سرکوب متاستاز این سلول‌ها می‌شود (۱۸). در این مطالعه، اثر آپوپتوزی آدنوزین مورد مطالعه قرار نگرفته است.

مطالعات نشان داده است که مسیرهای پیام‌رسانی در ارتباط با مولکول آدنوزین، نقش اساسی در فرایند ایمونو-متابولیک سلول‌های سرطانی دارد و علاوه بر تحریک تریاید سلولی، در سرکوب ایمنی و محافظت از سلول‌های سرطانی نیز نقش دارد. غلظت این مولکول‌ها در تومورها ممکن است تا حد میکرومولار افزایش پیدا کند و باعث سرکوب لنفوسیت‌های T و بقای سلول‌های سرطانی شود (۲۰-۱۹).



مطالعات نشان داده است که CHA به عنوان آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین A1 باعث فعال شدن و افزایش بیان کاسپاز ۳ و ۹ می‌شود؛ چرا که بر کاسپاز ۸ بی‌اثر است و تغییری در پتانسیل غشای میتوکندری‌ها در رده‌ی سلولی استروسیتوما PCR-1 نیز ایجاد نمی‌کند. 8-CPT به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌ی آدنوزین، باعث مهار آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (۲۱).

در رده‌ی سلولی سرطان کولون Caco2 مولکول آدنوزین با واسطه‌ی گیرنده‌ی آدنوزین نوع A2a باعث افزایش بیان و فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ می‌شود، اما بر کاسپاز ۸ بی‌تأثیر است (۲۲). همچنین، Cordycepin باعث القای آپوپتوز در سلول‌های گلیوما C6 با واسطه‌ی گیرنده‌های آدنوزین A2 و فعالیت P53، کاسپاز ۷ و PARP می‌شود (۲۳). مشخص شده است که فعالیت کاسپاز ۸ در اغلب تومورها کاهش می‌یابد، اما در برخی دیگر مانند گلیوبلاستوما که وابستگی به فعالیت

References

- Young A, Mittal D, Stagg J, Smyth MJ. Targeting cancer-derived adenosine: New therapeutic approaches. *Cancer Discov* 2014; 4(8): 879-88.
- Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: A new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 2010; 29(13): 1865-82.
- Gessi S, Varani K, Merighi S, Morelli A, Ferrari D, Leung E, et al. Pharmacological and biochemical characterization of A3 adenosine receptors in Jurkat T cells. *Br J Pharmacol* 2001; 134(1): 116-26.
- Sek K, Molck C, Stewart GD, Kats L, Darcy PK, Beavis PA. Targeting adenosine receptor signaling in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12).
- Merighi S, Battistello E, Giacomelli L, Varani K, Vincenzi F, Borea PA, et al. Targeting A3 and A2A adenosine receptors in the fight against cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2019; 23(8): 669-78.
- Jaafaru MS, Nordin N, Rosli R, Shaari K, Bako HY, Noor NM, et al. Prospective role of mitochondrial apoptotic pathway in mediating GMG-ITC to reduce cytotoxicity in H2O2-induced oxidative stress in differentiated SH-SY5Y cells. *Biomed Pharmacother* 2019; 119: 109445.
- Timofeev O, Klimovich B, Schneikert J, Wanzel M, Pavlakis E, Noll J, et al. Residual apoptotic activity of a tumorigenic p53 mutant improves cancer therapy responses. *EMBO J* 2019; 38(20): e102096.
- Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, gain-of-function, and therapy. *J Mol Biol* 2017; 429(11): 1595-606.
- Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(2): 89-102.
- Benit CP, Kerkhof M, Duran-Pena A, Vecht CJ. Seizures as complications in cancer. In: Schiff D, Arrillaga I, Wen PY, editors. *Cancer neurology in clinical practice: Neurological complications of cancer and its treatment*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2018. p. 153-69.
- Pearson JRD, Regad T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017; 2(1): 17040.
- Vlacich G, Tsien CI. High-Grade gliomas. In: Chang EL, Brown PD, Lo SS, Sahgal A, Suh JH, editors. *Adult CNS radiation oncology: Principles and practice*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2018. p. 83-102.
- Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee S. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(1): 3-9.
- Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. *Curr Med Chem* 2017; 24(27): 3002-9.
- Ceruti S, Abbraccio MP. Adenosine signaling in glioma cells. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1202: 13-33.
- Niechi I, Uribe-Ojeda A, Erices JI, Torres A, Uribe D, Rocha JD, et al. Adenosine depletion as a new strategy to decrease glioblastoma stem-like cells aggressiveness. *Cells* 2019; 8(11).
- Jafari SM, Joshaghani HR, Panjehpour M, Aghaei M. A2B adenosine receptor agonist induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer stem cells via ERK1/2 phosphorylation. *Cell Oncol (Dordr)* 2018; 41(1): 61-72.
- Oakes E, Anderson A, Cohen-Gadol A, Hundley HA. Adenosine deaminase that acts on RNA 3 (ADAR3) binding to glutamate receptor subunit B Pre-mRNA inhibits RNA editing in glioblastoma. *J Biol Chem* 2017; 292(10): 4326-35.
- Leone RD, Emens LA. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2018; 6(1): 57.
- Vigano S, Alatzoglou D, Irving M, Menetrier-Caux C, Caux C, Romero P, et al. Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-cell function. *Front Immunol* 2019; 10: 925.
- Sai K, Yang D, Yamamoto H, Fujikawa H, Yamamoto S, Nagata T, et al. A(1) adenosine receptor signal and AMPK involving caspase-9/-3 activation are responsible for adenosine-induced RCR-1 astrocytoma cell death. *Neurotoxicology* 2006; 27(4): 458-67.
- Yasuda Y, Saito M, Yamamura T, Yaguchi T, Nishizaki T. Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors. *J Gastroenterol* 2009; 44(1): 56-65.
- Chen Y, Yang SH, Hueng DY, Syu JP, Liao CC, Wu YC. Cordycepin induces apoptosis of C6 glioma cells through the adenosine 2A receptor-p53-caspase-7-PARP pathway. *Chem Biol Interact* 2014; 216: 17-25.
- Fianco G, Mongiardi MP, Levi A, De Luca T, Desideri M, Trisciuglio D, et al. Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. *Elife* 2017; 6.
- Saito M, Yaguchi T, Yasuda Y, Nakano T, Nishizaki T. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. *Cancer Lett* 2010; 290(2): 211-5.
- Lin Z, Yin P, Reierstad S, O'Halloran M, Coon VJ, Pearson EK, et al. Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptoralpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer. *Oncogene* 2010; 29(8): 1114-22.
- Saitoh M, Nagai K, Nakagawa K, Yamamura T, Yamamoto S, Nishizaki T. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(10): 2005-11.

Investigation the Effect of Adenosine A1 Receptor Agonist and Antagonist on P53 Gene Expression, and Apoptosis Pathways and Rate in U87Mg Multiform Glioblastoma

Fahimeh Zamani-Rarani¹, Zeinolabedin Shrifian-Dastjerdi², Ali Valiani³, Mohammad Zamani-Rarani², Elias Kargar-Abargouei², Ebrahim Eftekhari⁴, Majid Pouretezhari⁵, Javad Mohajer-Ansari²

Original Article

Abstract

Background: Improper prognosis in brain cancers requires new treatments. Using family of purinergic receptors with confirmed apoptotic effect can be beneficial. As the role of type A1 receptor in multiform glioblastoma in relation to the P53 gene and apoptotic pathways is not reported, we studied the role of agonist (N6-cyclopentyladenosine or CPA) and antagonist (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine or DPCPX) of this receptor on cell apoptosis and also expression of P53 genes and caspases 7, 8, and 9.

Methods: In this study, MTT assay was used to investigate the rate of cellular proliferation, and flowcytometry method with annexin and Pi was also used to investigate early and late cell apoptosis. To evaluate the internal and external apoptotic pathways expression of P53 genes and caspases 7, 8, and 9, real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT PCR) was used.

Findings: The treatment of U87Mg cells with DPCPX increased the expression of P53 gene. Expression of caspase 7 as an executive caspase and caspase 9 as a caspase of the mitochondrial pathway of apoptosis increased, but no expression change was observed in the caspase 8 gene.

Conclusion: The results of MTT and flowcytometry showed that DPCPX, in addition to suppressing cell proliferation, stimulated apoptosis in U87Mg cells. Inhibition of adenosine A1 receptors by stimulating the expression of genes involved in apoptotic pathways, especially mitochondrial pathway genes, suppressed cell proliferation and induced apoptosis in U87Mg cells.

Keywords: Receptor, Adenosine A1; Apoptosis; P53 genes

Citation: Fahimeh Zamani-Rarani F, Zeinolabedin Shrifian-Dastjerdi Z, Ali Valiani A, Mohammad Zamani-Rarani M, Kargar-Abargouei E, Eftekhari E, et al. **Investigation the Effect of Adenosine A1 Receptor Agonist and Antagonist on P53 Gene Expression, and Apoptosis Pathways and Rate in U87Mg Multiform Glioblastoma.** J Isfahan Med Sch 2021; 38(601): 875-81.

1- PhD Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran

3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Molecular Medicine Research Center, Hormozgan Health Institute, Hormozgan University of Medical Science, Bandar Abbas, Iran

5- Assistant Professor, Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Corresponding Author: Mohammad Zamani-Rarani, Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran; Email: mohammad.zamani@hums.ac.ir