

## بررسی اثرات گیرنده‌ی ۳-T-Cell Immunoglobulin Mucin (TIM-۳) در مهار تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)

نرگس زرگر بالاجمع<sup>۱</sup>، دکتر مهدی شعبانی<sup>۲</sup>، منصوره حقیقی<sup>۳</sup>، احمد علی بیات<sup>۴</sup>، دکتر محمود آقائی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** T-cell immunoglobulin-mucin (TIM) به گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی و Transmembrane اطلاق می‌شود. TIM-۳ دسته‌ای از TIMها می‌باشد که نقش مهمی در تکثیر، تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری دارا است. تحقیق حاضر جهت بررسی میزان بیان ژن TIM-۳ و نقش گالکتین-۹ به عنوان لیگاند گیرنده‌ی TIM-۳ در مهار تکثیر دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یا Acute lymphoblastic leukemia (مورد بررسی قرار گرفت).

**روش‌ها:** جهت بررسی میزان بیان ژن TIM-۳ در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ از روش Real-time polymerase chain reaction استفاده شد. سپس، میزان مهار رشد سلولی در سلول‌های حاصل از کشت رده‌های سلولی پیش‌گفته، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ (۱۰۰-۰/۰۱ نانومولار) با استفاده از روش MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** ژن TIM-۳ در هر دو نوع رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ در سطح mRNA بیان شد. میزان بیان TIM-۳ در رده‌ی سلولی Jurkat نسبت به KE-37، افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/001$ ); به طوری که، در رده‌ی سلولی Jurkat میزان بیان ژن TIM-۳ حدود ۳/۹ برابر در مقایسه با رده‌ی سلولی KE-۳۷ بود. همچنین، در هر دو رده‌ی سلولی، گالکتین-۹ در غلظت‌های بالاتر از ۱ نانومولار به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد اثر مهار تکثیر داشت ( $P < 0/050$ ).

**نتیجه‌گیری:** مطالعه‌ی حاضر یک مکانیسم احتمالی را در کنترل رشد سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد توسط گیرنده‌ی TIM-۳ معرفی می‌کند. بر اساس این مطالعه، گیرنده‌ی TIM-۳ در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ بیان می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه تأیید نمود که گالکتین-۹ دارای اثرات مهاری در تکثیر هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** T-cell immunoglobulin-mucin، گالکتین-۹، لوسمی لنفوبلاستیک حاد

**ارجاع:** زرگر بالاجمع نرگس، شعبانی مهدی، حقیقی منصوره، بیات احمد علی، آقائی محمود. بررسی اثرات گیرنده‌ی ۳-T-Cell Immunoglobulin Mucin (TIM-۳) در مهار تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL). مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۶۰-۱۲۵۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی ابن سینا، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، پژوهشکده‌ی آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی ابن سینا، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۵- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: maghaei@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمود آقائی

## مقدمه

لوسمی حاد شایع‌ترین بدخیمی کودکان است. ۷۷ درصد لوسمی‌های کودکان از نوع لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia یا ALL) و ۱۱ درصد از نوع میلو بلاستیک می‌باشد (۱-۲). در لوسمی لنفوبلاستیک حاد، پیش‌سازهای لنفوسیت T و B درگیر می‌شوند (۳). در سال‌های اخیر کشف روند مولکولی ایجاد و پیشرفت لوسمی لنفوبلاستیک حاد، منجر به شناسایی اهداف مولکولی سلول‌های سرطانی شده است؛ به طوری که با هدف قرار دادن مسیرهای انتقال پیام درون سلولی، می‌توان سلول‌های سرطانی را از بین برد (۴). انتقال پیام‌های مولکولی از سطح خارج سلول به داخل سلول از طریق اتصال لیگاند خارج سلولی به گیرنده‌ی خود صورت می‌گیرد که باعث فعال شدن آبشار داخل سلولی گیرنده می‌شود. به دنبال فعال شدن آبشار داخل سلولی، مسیرهای انتقال پیام درون سلولی در سلول فعال می‌گردد که در فرایندهای اساسی سلول از جمله تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش دارند (۴).

جستجو برای یافتن لیگاندها و گیرنده‌های جدید سطح سلولی جهت مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، منجر به شناسایی یک فامیل ژنی جدید شد که پروتئین‌های T-cell immunoglobulin-mucin (TIM) نام گرفتند (۵-۶). TIMها گلیکوپروتئین سطح سلولی و عبور کننده از غشا (Transmembrane) می‌باشند که یک دومین ایمونوگلوبولینی در ناحیه‌ی N-terminal، یک دومین شبه موسینی در ناحیه‌ی خارج سلولی و یک دم سیتوپلاسمی دارند و حاوی یک موتیف فسفریلاسیون تیروزین کینازی می‌باشند. TIMها بر اساس اندازه‌ی

دومین موسینی به سه انواع ۱-۸ تقسیم می‌گردند که فقط انواع ۱، ۳ و ۴ در انسان بیان می‌شود (۷-۸). TIM-۳ دارای کوچک‌ترین دومین موسینی در بین انواع TIMها است، اما دومین سیتوپلاسمی آن بزرگ‌تر از سایر TIMها می‌باشد؛ یعنی به جای یک تیروزین، ۵ تیروزین جهت فسفریلاسیون دارد. TIM-۳ باعث فسفریلاسیون STAT۳ (Signal transducer and activator of transcription۳) و IL۶ (Interleukin-۶) می‌گردد و با توجه به این‌که مسیر IL۶-STAT۳ نقش مهمی در متاستاز تومور ایفا می‌نماید، TIM-۳ از طریق این مسیر نقش مهمی را در تکثیر، تهاجم و متاستاز سلول‌های تومور دارد (۸-۱۰).

مطالعات اخیر حاکی از نقش TIM-۳ در سرکوب سیستم ایمنی وابسته به تومور می‌باشد. محققان نشان داده‌اند که بیان mRNA و پروتئین TIM-۳ در سرطان سرویکس در مقایسه با گروه شاهد افزایش داشته است. همچنین، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که افزایش بیان TIM-۳، باعث متاستاز تومور به سایر ارگان‌ها می‌گردد. در مطالعه‌ی دیگری نقش TIM-۳ در سلول‌های HeLa بررسی گردید و نشان داده شد که با استفاده از خاموش سازی ژن TIM-۳، مهاجرت، تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری HeLa کاهش می‌یابد (۱۱).

گالکتین-۹ یکی از اعضای خانواده‌ی لکتین و متصل شونده به  $\beta$ -گالاکتوزید و دارای دو دومین N و C ترمینال می‌باشد که با یک واسط کربوهیدراتی به هم متصل شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از عملکردهای گالکتین-۹ با واسطه‌ی گیرنده‌ی TIM-۳ صورت می‌گیرد و از گالکتین-۹ به عنوان

در دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پرداخت. در مرحله‌ی دوم، نقش گالکتین-۹ به عنوان لیگاند گیرنده‌ی TIM-۳ در مهار تکثیر دو رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد بررسی گردید.

### روش‌ها

کشت سلولی: رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ مربوط به لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی به صورت رشد داده شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از ضد عفونی کردن اطراف فلاسک‌ها با الکل ۷۰ درصد و مشاهده‌ی تراکم سلول‌ها زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به انکوباتور با شرایط ۵ درصد دی‌اکسید کربن، ۹۵ درصد هوای مرطوب و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شد. فلاسک‌ها روزانه به وسیله‌ی میکروسکوپ از نظر رشد و تراکم سلولی، مورفولوژی سلولی و همچنین، کنترل عدم آلودگی باکتریایی و قارچی مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت فلاسک‌ها هر ۲-۱ روز یکبار تعویض شد. برای تعویض محیط کشت فلاسک‌ها زیر هود لامینار، محیط کشت کهنه به همراه سلول‌ها به لوله‌های استریل منتقل و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده، محیط رویی خالی و رسوب حاصل به فلاسک‌ها که حاوی RPMI-۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute)، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین می‌باشد، اضافه شد. بررسی بیان گیرنده‌ی TIM-۳ در رده‌های سلولی

لیگاند گیرنده‌ی TIM-۳ استفاده شده است (۱۲-۱۳). در حال حاضر، مشخص شده است که گالکتین-۹ در فرایندهای سیکل سلولی، آپوپتوز، متاستاز و آنژیوژنز دخالت دارد (۱۴-۱۵). در چندین مطالعه گزارش گردید که گالکتین-۹ باعث مهار تکثیر انواع مختلف سلول‌های سرطانی مانند لوسمی، Burkitt's lymphoma, Multiple myeloma و Hodgkin می‌شود و این اثرات از طریق اتصال به گیرنده‌ی TIM-۳ صورت می‌گیرد (۱۶).

مطالعه‌ی Kobayashi و همکاران نشان داد که گالکتین-۹ باعث مهار تکثیر سلول‌های میلوما می‌شود (۱۷). در مطالعه‌ی دیگری گزارش گردید که گالکتین-۹ منجر به مهار رشد سلول‌های ملانوما می‌گردد (۱۸). همچنین، گالکتین-۹ با اتصال به TIM-۳ باعث القای آپوپتوز در سلول‌های T تمایز یافته‌ی بالغ و به میزان کمتر در سلول‌های CD8<sup>+</sup> T و علاوه بر این، باعث مهار پاسخ‌های سلول Th۱ و کاهش INF (Interferon) می‌گردد (۱۹). با توجه به نقش مهمی که گیرنده‌ی TIM-۳ در توسعه، گسترش و عملکرد تومور دارد، تعیین الگوی بیان و ترسیم نحوه‌ی عملکرد آن‌ها برای انتخاب شیوه‌ی درمانی، می‌تواند از اهمیت فراوانی برخوردار باشد. همچنین، تعیین مقادیر کمی بیان ژن TIM-۳ در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد، از جمله اولین اقدامات برای فرایندهای درمانی در سرطان به شمار می‌رود.

از آن‌جایی که مرحله‌ی اول در مورد اثرات TIM-۳، بررسی میزان بیان ژنی آن از طریق بررسی mRNA می‌باشد، تحقیق حاضر با استفاده از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)، به بررسی میزان بیان ژن TIM-۳

کمی از دستگاه NanoDrop استفاده شد. سنتز cDNA (واکنش نسخه‌برداری معکوس RT): برای دستیابی به cDNA با کیفیت بالا، RNA استخراج شده از مرحله‌ی قبل برای هر یک از رده‌های سلولی Jurkat و KE-37، بلافاصله به منظور ساخت cDNA توسط کیت M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H Vivantis مورد استفاده قرار گرفت. مراحل واکنش بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر به انجام رسید. به ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده در مرحله‌ی قبل، ۱ میکرولیتر Oligo dT، ۱ میکرولیتر dNTP (Deoxynucleotide) و ۳ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز اضافه گردید و در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۲ میکرولیتر بـا فـا ر آنـزیم M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) و ۱ میکرولیتر آنزیم RT M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptase) اضافه و در نهایت با ۷ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز، حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. محصول نهایی تا زمان انجام واکنش Real-time PCR در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش Real-time PCR با استفاده از SYBER Green: واکنش Real-time RT PCR توسط دستگاه (Corbett) Rotor-Gene 6000 و با استفاده از کیت AMPLIQON انجام گرفت. بدین ترتیب که به ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس

KE-۷ و Jurkat لوسمی لنفوبلاستیک حاد با استفاده از روش Real-Time PCR: استخراج RNA سلولی: استخراج RNA تام سلولی با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سینا کلون) و بر اساس دستورالعمل کیت به شرح زیر انجام شد. حدود یک میلیون سلول از هر رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 برداشته شد و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه (در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) سانتریفوژ گردید. محیط رویی دور ریخته شد و رسوب باقی‌مانده ورتکس گردید. سپس، ۱ میلی‌لیتر محلول سرد RNX-Plus به نمونه‌ها اضافه و ۳۰ ثانیه ورتکس و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی با Shake کردن مخلوط شد. نمونه‌ها روی یخ به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز مایع هر یک از نمونه‌ها به یک میکروتیوب فاقد RNase انتقال داده شد و به حجم برابر این فاز مایع، ایزوپروپانول اضافه گردید. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و دوباره با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید و کمی ورتکس و مجدد به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه (در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) سانتریفوژ انجام گرفت. محلول رویی به طور کامل برداشته شد و رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNase و DNase حل گردید. پس از استخراج RNA، برای بررسی

روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- $\beta$ -[Methyl-3-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]: برای ارزیابی سیتوتوکسیسیته، در هر چاهک پلیت‌های ۹۶‌تایی،  $10^3 \times 5$  از هر کدام رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها وارد فاز رشد شدند، تیمار گردیدند. بدین ترتیب، غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ (۱۰۰-۰/۰۱ نانومولار) که در محیط RPMI تهیه شده بود، به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد و به چاهک‌های شاهد، محیط کشت کامل اضافه گردید. پس از ۴۸ ساعت، ۲۰ میکرولیتر رنگ MTS به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، جذب محلول هر چاهک در مقابل شاهد، در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه مولتی پلیت ریدر (Biotech, Synergy) ساخت کشور آمریکا خوانده شد. نتایج بر حسب درصد سلول‌های زنده تیمار شده نسبت به شاهد، از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

درصد سلول‌های زنده (Viability) = (میانگین جذب سلول‌های شاهد / میانگین جذب سلول‌های بیمار)  $\times 100$

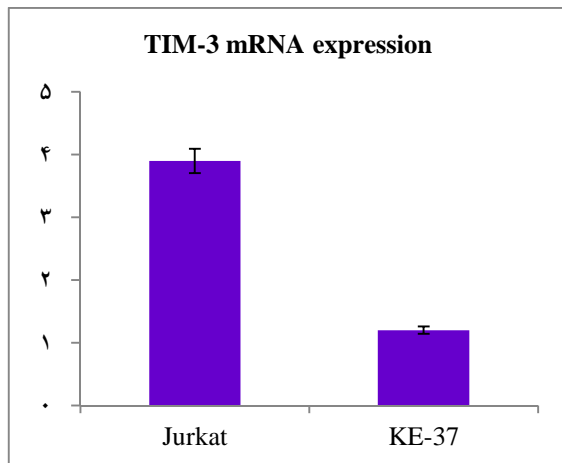
AMPLIQON، ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های TIM-۳ و Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (جدول ۱) و ۷/۵ میکرولیتر آب فاقد RNase و DNase اضافه گردید و حجم نهایی هر واکنش، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. سپس، برنامه‌ی حرارتی Real-time PCR در دو مرحله که مرحله‌ی اول (Denaturation) به مدت ۱۵ دقیقه برای یک سیکل و مرحله‌ی دوم (Annealing و Polymerization) برای ۴۰ سیکل به ترتیب در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه به دستگاه داده شد. پس از این که واکنش به اتمام رسید، دستگاه اطلاعاتی را نمایش داد که از جمله مهم‌ترین آن، منحنی پیش‌سرفت واکنش و Ct (Crossing of threshold) می‌باشد. بعد از به دست آمدن تمام Ct‌ها (ژن کنترل و ژن اصلی)، از روش محاسباتی دلتا دلتا Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) برای به دست آوردن نسبت بیان ژن در دو سلول استفاده گردید. سپس با استفاده از معادله  $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، میزان نسبی افزایش بیان ژن مورد نظر در دو رده سلولی محاسبه می‌شود. بررسی سیتوتوکسیسیته با استفاده از

جدول ۱. توالی پرایمر ژن‌های GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) و TIM-۳

## (T-Cell Immunoglobulin Mucin-۳)

ژن	توالی پرایمرها	کد ژن
GAPDH	Forward 5'-CTCCCCTTCGCTCTCTG-3' Revers 5'-TCCGTTGACTCCGACCTTC-3'	NM-001289745.1
TIM-۳	Forward 5'-TCCAAGGATGCTTACCACCAG-3' Revers 5'-GCCAATGTGGATATTTGTGTTAGATT-3'	AB924452.1

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TIM-۳: T-Cell immunoglobulin mucin



شکل ۱. میزان بیان ژن TIM-3 در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37

تمام تست‌ها به صورت تکرار سه‌تایی انجام شد و نتایج بر اساس درصد بقای سلول‌ها نسبت به گروه شاهد (میزان بقا در گروه شاهد ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد) و به صورت میانگین و انحراف معیار در مقایسه با شاهد ارایه گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA (Dunnett's test) در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.  $P < 0/05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

#### مقایسه‌ی الگوی بیان گیرنده‌ی TIM-3 در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37

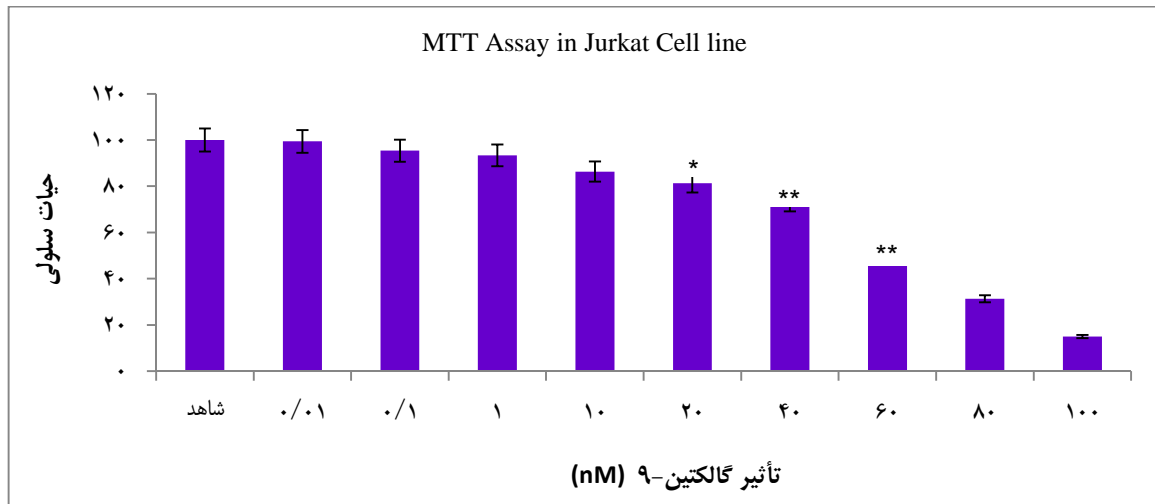
واکنش Real-time PCR برای هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37، با استفاده از رنگ SYBER Green برای دو ژن TIM-3 و GAPDH (به عنوان شاهد داخلی) صورت گرفت. بعد از به دست آمدن اطلاعات مربوط به Ct واکنش‌ها و انجام محاسبات بر روی داده‌ها، میانگین نسبی بیان ژن TIM-3 در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 محاسبه گردید. همچنین، با انجام تجزیه و تحلیل آماری بر روی داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA، معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بررسی شد. نسبت میانگین بیان TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat در مقایسه با رده‌ی سلولی KE-37، حدود ۳/۹ برابر بود ( $P > 0/001$ ) که نشان می‌دهد بیان نسبی TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat حدود چهار برابر بیشتر از بیان این ژن در رده‌ی سلولی KE-37 می‌باشد (شکل ۱).

#### تأثیر لیگاند گیرنده‌ی TIM-3 بر روی تکثیر رده‌های سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد با استفاده از تست MTS

اثر لیگاند گیرنده‌ی TIM-3 (گالکتین-۹) در مهار تکثیر رده‌های سلولی (Jurkat و KE-37) لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسان با استفاده از تست MTS بررسی شد. در نهایت درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 در غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ به دست آمد. به این ترتیب که سلول‌های مورد نظر تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت گالکتین-۹ (۱۰۰-۰/۰۱ نانومولار) قرار گرفت و ۴۸ ساعت انکوبه شد. نتایج پس از پایان زمان انکوباسیون نشان داد که گالکتین-۹ در غلظت‌های پایین (۱-۰/۰۱ نانومولار) در مقایسه با شاهد اثر قابل ملاحظه‌ای نداشت و کاهش معنی‌داری در درصد سلول‌های زنده مشاهده نشد ( $P > 0/050$ )؛ در حالی که تیمار سلول‌ها با غلظت‌های بالاتر گالکتین-۹ (۱۰۰-۱ نانومولار) در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد و این تأثیر گالکتین-۹ وابسته

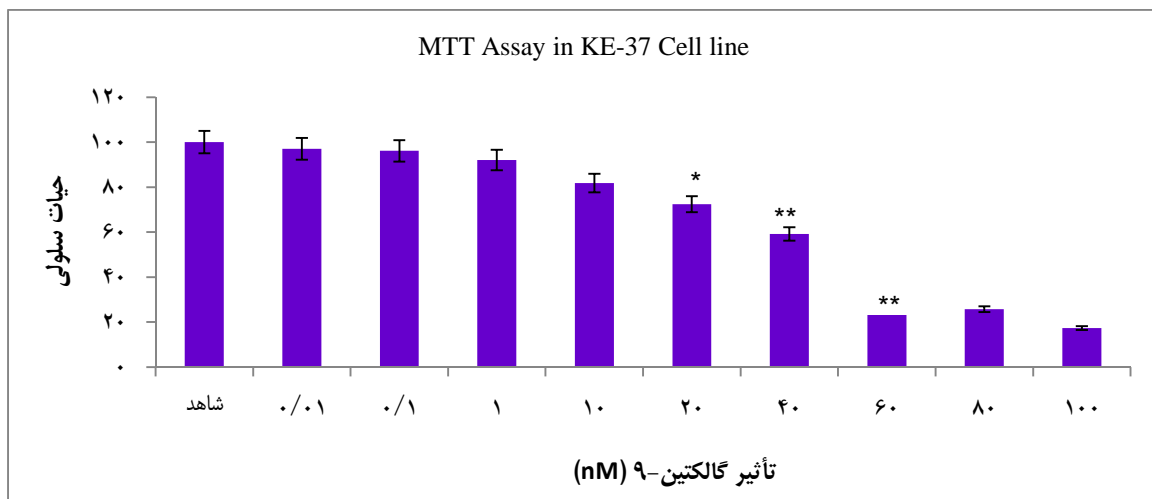
به غلظت بود ( $P < 0/050$ ). همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیشترین میزان مهار تکثیر سلولی، در غلظت ۱۰۰ نانومولار گالکتین-۹ می‌باشد؛ به طوری که درصد سلول‌های زنده در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ به ترتیب به ۱۵ و ۱۷/۳۹ درصد رسید.

همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت گالکتین-۹ در هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷، درصد سلول‌های زنده در غلظت ۱ نانومولار به صورت معنی‌داری کاهش یافت



شکل ۲. تأثیر گالکتین-۹ در مهار رشد سلول لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی Jurkat

سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ تیمار شدند و درصد زنده ماندن آن‌ها پس از ۴۸ ساعت به وسیله‌ی تست MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] اندازه‌گیری گردید. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد.  $P < 0/050^*$  و  $P < 0/010^{**}$  معنی‌دار است.



شکل ۳. تأثیر گالکتین-۹ در مهار رشد سلول لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسانی KE-۳۷

سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گالکتین-۹ تیمار شدند و درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت به وسیله‌ی تست MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] اندازه‌گیری گردید. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد.  $P < 0/050^*$  و  $P < 0/010^{**}$  معنی‌دار است.

## بحث

مطالعات اخیر حاکی از نقش TIM-3 در سرکوب سیستم ایمنی وابسته به تومور می‌باشد. محققان نشان داده‌اند که بیان mRNA و پروتئین TIM-3 در سلول‌های بافت سرطان سرویکس افزایش می‌یابد. همچنین، نتایج تحقیقات گزارش کرده‌اند که افزایش بیان TIM-3 باعث متاستاز تومور به سایر ارگان‌ها می‌گردد. در مطالعه‌ی دیگری نقش TIM-3 در سلول‌های HeLa بررسی گردید و نشان داده شد که با استفاده از خاموش سازی ژن TIM-3، مهاجرت، تهاجم و متاستاز سلول‌های توموری HeLa کاهش می‌یابد (۱۱). مطالعات به این نتیجه رسیده‌اند که TIM-3 در بافت‌های بدخیم سرطان پروستات نسبت به بافت‌های خوش خیم و بافت‌های طبیعی، میزان بیان بیشتری دارد. همچنین، نشان داده شد که بیان TIM-3 پیش آگهی ضعیفی در سرطان پروستات دارد (۲۰). افزایش بیان TIM-3 در سرطان ریه نیز مشاهده شده است (۲۱). مطالعات جدید حاکی از آن است که TIM-3 در سلول‌های بنیادی لوکمیک بیان می‌گردد. سلول‌های بنیادی لوکمیک به علت سطح بالای بیان CD<sub>۱۳۳</sub> و پروتئین‌های دیگری مانند TIM-3 و CD<sub>۳۴</sub> روی سطح سلولی‌شان، با انواع طبیعی سلول‌های بنیادی متفاوت هستند (۲۲-۲۳).

تحقیقی در مورد بیان TIM-3 در سطح ژن در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ لوسمی لنفوبلاستیک حاد انسان انجام نگرفته است. از این رو، تحقیق حاضر بر مبنای تحلیل و بررسی گیرنده‌ی TIM-3 بر روی سطوح بیان ژن و بررسی اثرات لیگاند TIM-3 (گالکتین-۹) در رده‌های سلولی Jurkat و KE-۳۷ هدف‌گذاری گردید. از آن‌جا که

اولین قدم در مورد تعیین گیرنده‌ی TIM-3، بررسی میزان بیان ژن آن‌ها از طریق بررسی mRNA مربوط به آن‌ها می‌باشد، تحقیق حاضر با استفاده از روش Real-time PCR به منظور بررسی میزان بیان (تفاوت کمی) در دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ انجام گرفت. بهترین روش برای تعیین کمی مقادیر بیان ژن، روش Real-time PCR است. این روش قادر به تحلیل مقادیر کمی بیان یک ژن با دقت و صحت بالا می‌باشد و می‌تواند نتایج مفیدی را برای مقاصد تحقیقاتی و در نهایت مقاصد درمانی ارائه دهد. نتایج به دست آمده بدین صورت بود که ژن TIM-3 در هر دو نوع رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ در سطح mRNA بیان می‌گردد. از آن‌جا که روش استفاده شده در این مرحله به صورت کمی بود، امکان مقایسه‌ی میزان بیان ژن TIM-3 در سطح mRNA را بین رده‌ی سلولی Jurkat و KE-۳۷ فراهم می‌کرد.

بر اساس نتایج بررسی حاضر، میزان بیان TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat نسبت به KE-۳۷، افزایش معنی‌داری ( $P < ۰/۰۰۱$ ) داشت؛ به طوری که میزان بیان ژن TIM-3 در رده‌ی سلولی Jurkat، حدود ۳/۹ برابر در مقایسه با رده‌ی سلولی KE-۳۷ بود.

گالکتین-۹ باعث مهار تکثیر سلول‌های میلوما با مهار مسیر سیگنالینگ Jun N-terminal kinase (JNK) و P۳۸ می‌شود (۱۷). همچنین، باعث مهار رشد سلول‌های ملانوما می‌گردد. مسیرهای درگیر در مرگ سلولی که توسط گالکتین-۹ القا می‌شود، شامل آپوپتوز وابسته به کاسپاز (۲۴، ۱۹، ۱۳)، فعال‌سازی Ca<sup>۲+</sup>/Calpain، آزادسازی فاکتورهای پیش‌میتوکندریایی یا مهار پیشرفت چرخه‌ی سلولی می‌باشد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز پس از اثبات



گیرنده‌ی TIM-3 معرفی می‌کند و بر این اساس، گیرنده‌ی TIM-3 در رده‌های سلول‌های Jurkat و KE-37 بیان می‌گردد. همچنین، نتایج تأیید نمود که گالکتین-9 اثرات مهاری در تکثیر هر دو رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 دارد. بدین جهت، انجام مطالعات آزمایشگاهی بیشتر جهت مشخص نمودن مکانسیم‌های آپوپتوز دخیل در مرگ سلولی پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوشیمی بالینی به شماره‌ی طرح ۳۹۳۴۸۴ دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

بیان TIM-3 در سطح mRNA، اثر گالکتین-9 در مهار تکثیر سلولی بر روی رده‌ی سلولی Jurkat و KE-37 بررسی گردید. همچنین، نتایج نشان داد که گالکتین-9 در غلظت‌های بالاتر از ۱ نانومولار، باعث مهار رشد سلول‌های Jurkat و KE-37 می‌شود؛ در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر (۰/۰۱-۱ نانومولار) این اثر مشاهده نشد. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، گالکتین-9 در بیشترین غلظت مورد بررسی در رده‌ی Jurkat، درصد سلول‌های زنده را تا ۱۵ درصد و در KE-37 تا ۱۷/۳۹ درصد کاهش می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر یک مکانسیم احتمالی را در کنترل رشد سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد توسط

### References

- Bomken SN, Vormoor JH. Childhood leukaemia. *Paediatr Child Health* 2009; 19(8): 345-50.
- Tubergen DG, Bleyer A. Leukemia. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. *Nelson textbook of pediatrics*. 17<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2004. p. 1694-7.
- Parikh C, Ren R. Mouse model for NRAS-induced leukemogenesis. *Methods Enzymol* 2008; 439: 15-24.
- Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. *Oncologist* 2003; 8(Suppl 3): 5-17.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7): 2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.
- Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; 415(6871): 536-41.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272(5258): 60-6.
- Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007; 318(5853): 1141-3.
- van de Weyer PS, Muehlefeit M, Klose C, Bonventre JV, Walz G, Kuehn EW. A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351(2): 571-6.
- Cao Y, Zhou X, Huang X, Li Q, Gao L, Jiang L, et al. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PLoS One* 2013; 8(1): e53834.
- Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(27): 16976-84.
- Yoshida H, Teraoka M, Nishi N, Nakakita S, Nakamura T, Hirashima M, et al. X-ray

- structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J Biol Chem* 2010; 285(47): 36969-76.
14. Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, Koelle DM, et al. Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression. *Nat Med* 2011; 17(8): 989-95.
  15. Ishikawa A, Imaizumi T, Yoshida H, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Double-stranded RNA enhances the expression of galectin-9 in vascular endothelial cells. *Immunol Cell Biol* 2004; 82(4): 410-4.
  16. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, et al. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 2003; 170(7): 3631-6.
  17. Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, et al. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia* 2010; 24(4): 843-50.
  18. Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, Seki M, Abedin MJ, Nishi N, et al. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer* 2002; 99(6): 809-16.
  19. Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(26): 10650-5.
  20. Piao YR, Piao LZ, Zhu LH, Jin ZH, Dong XZ. Prognostic value of T cell immunoglobulin mucin-3 in prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(6): 3897-901.
  21. Zhuang X, Zhang X, Xia X, Zhang C, Liang X, Gao L, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. *Am J Clin Pathol* 2012; 137(6): 978-85.
  22. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(6): 708-17.
  23. Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011; 117(17): 4501-10.
  24. Sehrawat S, Reddy PB, Rajasagi N, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog* 2010; 6(5): e1000882.

## Evaluating T-Cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) Receptor in the Growth Inhibition of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cell Lines

Narges Zargar-Balajam<sup>1</sup>, Mahdi Shabani PhD<sup>2</sup>, Mansoreh Haghighi MSc<sup>3</sup>,  
Ahmad Ali Bayat MSc<sup>4</sup>, Mahmoud Aghaei PhD<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** T-cell immunoglobulin-mucin (TIM) is a cell-surface and transmembrane glycoprotein. TIM-3 plays a pivotal role in proliferation, invasion and metastasis of tumor cells. The present study was designed to evaluate the expressions of the TIM-3 and the role of the galectin-9, as TIM-3 ligand, in the regulation of cell proliferation in human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell lines.

**Methods:** The expression level of TIM-3 was examined in the Jurkat and KE-37 cell lines using real-time polymerase chain reaction method. MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] viability test was used to study the cell proliferation effect of galectin-9.

**Findings:** TIM-3 mRNAs were detected in the both Jurkat and KE-37 cell lines. The expression of TIM-3 in Jurkat cell line was higher than KE-37 cell line ( $P < 0.001$ ). The MTS assay revealed that galectin-9 reduced cells proliferation in a dose-dependent manner ( $> 1$  nM) in the both cell lines ( $P < 0.050$ ).

**Conclusion:** The present investigation introduced a possible mechanism for the control of acute lymphoblastic leukemia cell proliferation through TIM-3 and demonstrated that galectin-9 can inhibit the proliferation of Jurkat and KE-37 cell lines.

**Keywords:** T-cell immunoglobulin-mucin, Galectin-9, Acute lymphoblastic leukemia

**Citation:** Zargar-Balajam N, Shabani M, Haghighi M, Bayat AA, Aghaei M. **Evaluating T-Cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) Receptor in the Growth Inhibition of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1250-60

1- MSc Student, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

3- PhD Student, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, The Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Mahmoud Aghaei PhD, Email: maghaei@pharm.mui.ac.ir