

طراحی وکتور لنتی ویروسی بیان کننده ژن آپوپتین و تاثیر سائیتوتوکسیک آن در سلول های لوسمی لنفوبلاستیک حاد Reh

علی انجام نجم الدینی (MSc)^۱، روح الله وهابپور (PhD)^۲، فاطمه جلالی (MD)^۲، داود بشاش (PhD)^{۱*}

۱- گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی بم، بم، ایران

دریافت: ۹۶/۷/۲۸، اصلاح: ۹۶/۱۱/۴، پذیرش: ۹۶/۱۲/۲

خلاصه

سابقه و هدف: مقاومت به داروهای شیمی درمانی یکی از مهمترین مشکلات درمانی بیماران مبتلاء به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia) می باشد. آپوپتین به دلیل توانایی القاء اختصاصی آپوپتوز در سلول های توموری، پتانسیل انکار ناپذیری در درمان سرطان به خصوص مواردی که به شیمی درمانی پاسخ کمتری می دهند، دارد. از این رو، در این مطالعه اثر القاء بیان آپوپتین را در القاء مرگ سلولی در لنفوبلاست های بدخیم رده سلولی Reh مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، بعد از کشت سلول های Reh (تهیه شده از انستیتو پاستور) میزان ورود وکتور لنتی ویروسی، فعالیت متابولیک و قدرت تکثیر سلول ها به ترتیب با استفاده از فلوسایتمتری، MTT و تریپان بلو در ساعت های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بررسی شد. همچنین جهت بررسی میزان بیان ژن آپوپتین از Real time PCR استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده طراحی و ساخت مناسب وکتور لنتی ویروسی است که توانسته بیش از ۶۵٪ سلول ها را آلوده کند. همچنین پس از آلوده کردن سلول ها با وکتور، میزان بیان ژن آپوپتین حدود ۱۰ برابر نسبت به کنترل افزایش یافته و به دنبال آن درصد زنده ماندی سلول ها به طور وابسته به زمان تا ۵۳٪ کاهش یافت ($p < 0.01$). همچنین نتایج، نشان دهنده تاثیر مهاری بیان ژن آپوپتین بر فعالیت متابولیک سلول های Reh تا ۳۵٪ بود ($p < 0.01$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بیان ژن آپوپتین دارای فعالیت ضد توموری بروی سلول های Reh بوده و می تواند به عنوان درمانی امیدبخش در ALL استفاده گردد.

واژه های کلیدی: آپوپتین، وکتور لنتی ویروس، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، رده سلولی Reh.

مقدمه

پرنندگان (Chicken Anemia Virus) جدا شده است. این ویروس کوچک از طریق ایجاد آپوپتوز منجر به ایجاد اثرات سائیتوتونیک در تیموسیت های پرنندگان می شود. در ژنوم این ویروس سه پروتئین VP1 (51.6kDa)، VP2 (24.0kDa)، VP3 (13.6 kDa) که می شود که ژن VP1 کدکننده پروتئین کسپید ویروس؛ VP2 کد کننده پروتئین Dual=DPS specificity protein phosphatase که باعث ایجاد سیگنال های مهمی برای تکثیر ویروس می شود VP3 که همان آپوپتین نام دارد و قادر است به تنهایی باعث القاء مرگ سلولی در بسیاری از سلول ها شود (۳). ژن درمانی روش نوینی است که امروزه به دلیل نقشی که در درمان بیماری های ژنتیکی و انواع سرطان ها دارد، بسیار مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. هدف اصلی این روش، انتقال یک ژن خاص به سلول هدف و به تبع آن بیان آن ژن در سلول، در جهت ایجاد اثرات درمانی است (۹). امروزه از لنتی ویروس ها به عنوان روشی

علیرغم پیشرفت های قابل توجه درمانی طی دهه های اخیر، لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) هنوز به عنوان یکی از مرگبارترین بدخیمی های هماتولوژیک در سراسر جهان شناخته میشود (۱و۲). آپوپتین به دلیل توانایی القای اختصاصی آپوپتوز در سلول های سرطانی، پتانسیل انکار ناپذیری در درمان سرطان، به خصوص مواردی که به شیمی درمانی پاسخ کمی می دهند، دارد (۳). یکی از ویژگی های قابل توجه در مورد ژن آپوپتین عملکرد اختصاصی آن در القاء مرگ سلولی در سلول های سرطانی گوناگونی از جمله هیپاتوما، استئوسارکوما، ملانوما، سرطان کولون، ریه، سینه، پروستات، دهانه رحم و معده است در حالی که هیچ گونه تاثیری بر القاء آپوپتوز در سلول های طبیعی بدن گزارش نشده است (۳-۶). مکانیسم عمل آپوپتین هنوز به طور کامل مشخص نشده اما عمل القای اختصاصی آپوپتوز در برخی سلول های سرطانی نشان داده شده است (۷و۸). ژن آپوپتین از ویروس کم خونی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد آقای علی انجام نجم الدینی می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر داود بشاش

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون. تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴

E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

آزمایش بدین ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر می‌باشند، حال آنکه سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند. برای شمارش تعداد سلول‌های زنده، بعد از مجاورت سلول‌ها با LV-GFP-Apoptin، در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ تعداد سلول‌های رنگ نگرفته در هر چهار سری خانه‌های شانزده‌تایی (خانه شمارش WBC) شمارش شده و میانگین گرفته شد. **اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی به روش MTT assay:** به منظور ارزیابی اثر سایتوتوکسیک بیان ژن آپوپتین در سلول‌ها و تعیین مقادیر IC₅₀ از روش MTT استفاده شد. به همین منظور، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد LV-GFP-Apoptin اضافه و به مدت زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر به سلول‌های داخل پلیت محلول MTT (۵ mg/ml) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه plate Eliza reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real Time PCR: پس از تیمار سلول‌های Reh با وکتور لنتی‌ویروسی به مدت ۴۸ ساعت RNA آنها طبق دستورالعمل کیت high pure RNA isolation kit (Roche) استخراج شده و به منظور تولید cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای سنتز cDNA کیت Revertaid first strand cDNA synthesis kit استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ میکرولیتر است و محتویات محلول فوق به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه، ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و یک ساعت در دمای ۴۲ درجه انکوبه شدند و در نهایت، واکنش سنتز cDNA با ۵ دقیقه انکوباسیون در ۷۰ درجه خاتمه می‌یابد. cDNA تهیه شده در دمای ۲۰- نگهداری می‌شود. آزمایش Real-Time PCR در دستگاه light-cycler (Roche) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش ۱۰ میکرولیتر از Syber premix Ex Taq (Takara)، ۲ میکرولیتر از cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (جدول ۱) و ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۰ سیکل برای دناوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل Mean $\pm$ SD قید شدند. همچنین برای محاسبات آماری از روش T-Test و نرم افزار SPSS17 و GraphPad Prism7 استفاده شد و $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

برای انتقال ژن‌ها استفاده می‌شود. لنتی‌ویروس‌ها یکی از ساب‌تایپ‌های رتروویروس‌ها و دارای RNA هستند که توانایی خاص تبدیل RNA خودشان به DNA و در رشته‌ای را دارند که این DNA می‌تواند به ژنوم سلول میزبان وارد شود و در آن جای بگیرد. از این ویژگی در جهت ساخت وکتورهایی با کاربردهای درمانی استفاده شده است. بعلاوه وکتورهای لنتی‌ویروسی می‌توانند طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌ها را آلوده کنند در عین حال که در مقایسه با وکتورهای ویروسی دیگر، سمیت بسیار کمتری دارند (۹۰ و ۱۰). از این رو در این مطالعه با وارد کردن آپوپتین بوسیله وکتور لنتی‌ویروسی به سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد اثر آپوپتین در القای مرگ سلولی در لنفوبلاست‌های بدخیم سل‌لاین Reh مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های Reh که از رده لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌باشند، در محیط کشت RPMI-1640 و سلول‌های HEK293T در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسید کربن ۵٪ کشت داده شدند.

ساخت و تیتراسیون وکتور لنتی‌ویروسی بیان کننده ژن آپوپتین: به منظور ساخت وکتور لنتی‌ویروسی از سه پلاسمید pCDH (پلاسمید انتقال دهنده ژن)، pMD2G (پلاسمیدی برای ساخت پوشش وکتور لنتی‌ویروس)، psPAX2 (حاوی ژن‌های سازنده کپسید وکتور لنتی‌ویروسی) استفاده می‌شود. وکتور لنتی‌ویروسی دارای ژن آپوپتین (LV-GFP-Apoptin) از پلاسمید pCDNA3.1-GFP-Apoptin توسط روش PCR Cloning تهیه شده است. بدین منظور پرایمری برای آپوپتین داخل پلاسمید pCDNA طراحی شد که حاوی دو جایگاه برش برای آنزیم‌های ECORI و BamHI در دو سمت خود بود، پس از انجام PCR باند الکتروفورز مربوط به ژن آپوپتین از ژل استخراج شده و سپس به داخل پلاسمید pCDH منتقل شد. در ادامه هر سه پلاسمید (pCDH، psAX2 و pMD2G) توسط PolyFect- Transfection-Reagent بداخل رده سلولی HEK293T منتقل و در ادامه ویروس در ساعت‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ برداشت شد. برای تغلیظ ویروس نیاز به التراسانتریفیوژ به مدت ۳ ساعت است. به منظور تیتراسیون ویروس تغلیظ شده میزان پروتئین p24 توسط کیت الایزای کمی اندازه‌گیری می‌شود. محاسبه تعداد ویروس نیز با در نظر گرفتن هر ۲۰۰۰ ملکول p24 برای هر ویروس انجام می‌شود. این روش برای هر دو وکتور لنتی‌ویروسی دارای ژن آپوپتین و فاقد ژن آپوپتین انجام شد و در این پژوهش برای کلیه تست‌ها از MOI، ۵ استفاده شد.

بررسی شمارش سلولی به روش تریپان بلو: برای بررسی قدرت تکثیر سلول‌ها از رنگ‌آمیزی تریپان بلو و لام هموسایتومتر (لام نتوبار) استفاده شد. اساس این

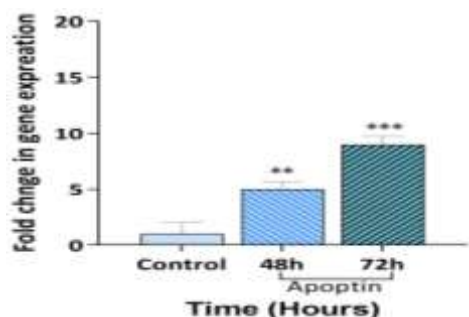
جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size(bp)
Apoptin	ACTCTATCGCTGTGTGGC	TCGCTTACCCTGTACTCG	۳۶۶

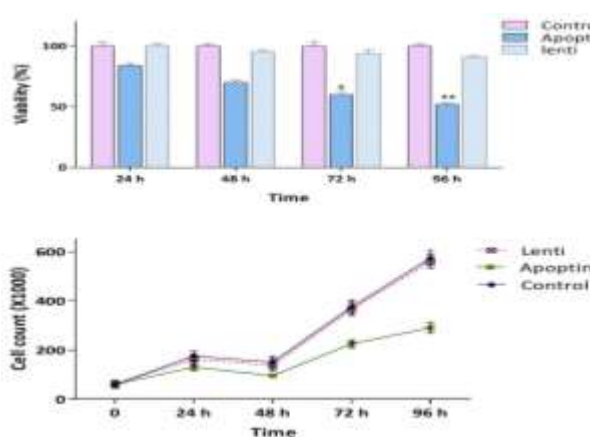
یافته ها

بررسی تیتراسیون و میزان ورود وکتور لنتی ویروسی به داخل سلول های Reh :
میزان ورود LV-GFP-Apoptin به داخل سلول های Reh، با میکروسکوپ فلورسانت و فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. میزان سلول های GFP مثبت در سلول های Reh درمقایسه با سلول های کنترل که کمتر از ۱ درصد دارای سلول های GFP مثبت بودند، به بیش از ۶۵ درصد رسید. که این نتایج با عکس های گرفته شده از سلول ها بعد از ۴۸ ساعت مواجهه با وکتور لنتی ویروسی بیان کننده ژن آپوپتین مطابقت داشته و میزان بالای سلول های GFP مثبت که به رنگ سبز مشاهده می شوند نشان از درصد بالای ورود وکتور لنتی ویروسی می باشد (شکل ۱).

بررسی میزان بیان ژن آپوپتین: به منظور بررسی بیان آپوپتین پس از ورود وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن آپوپتین به داخل سلول های رده سلولی Reh، در ساعت ۴۸ و ۷۲ سلول ها جمع آوری شده و برای آپوپتین، RT-PCR انجام شد. که نتایج نشان داد، بیان آپوپتین در سلول های آلوده شده به LV-GFP-Apoptin در ۴۸ ساعت حدود ۵ برابر ($p \leq 0.01$) و در ۷۲ ساعت تا حدود ۹ برابر ($p < 0.001$) افزایش یافته است (شکل ۲).

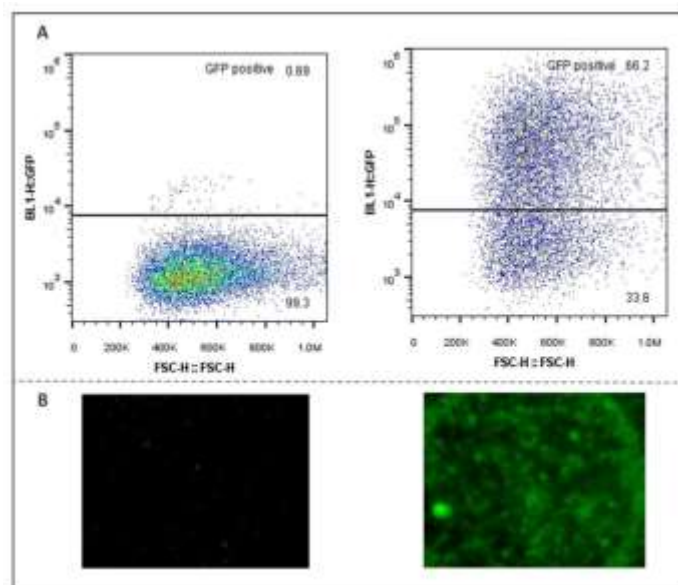


شکل ۲. مقایسه بیان ژن آپوپتین بعد از ورود وکتور لنتی ویروسی بیان کننده ژن آپوپتین. جهت بررسی بیان ژن آپوپتین بعد از ورود وکتور به سلول ها در ساعت های ۴۸ و ۷۲ تست Real Time انجام شده و افزایش بیان مشاهده شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($\text{mean} \pm \text{SD}$) محاسبه و p به دست آمده (**، بیانگر $p \leq 0.01$ ، *** $p < 0.001$) نشانگر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۳. بررسی تاثیر بیان ژن آپوپتین بر پرولیفراسیون و درصد زنده ماندن سلول ها Reh. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($\text{mean} \pm \text{SD}$) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر $p < 0.05$ ، **، بیانگر $p < 0.01$) نشانگر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بیان ژن آپوپتین در سلول های Reh وابسته به زمان باعث کاهش فعالیت متابولیک سلولی می شود: به منظور بررسی فعالیت متابولیک در سلول های Reh بعد از مواجه کردن سلول ها LV-GFP-Apoptin جهت بررسی فعالیت متابولیک سلول ها تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیان ژن آپوپتین قادر است میزان فعالیت متابولیک سلول های Reh را وابسته به زمان کاهش دهد و به این ترتیب اثر سایتوتوکسیک خود را در این رده سلولی اعمال می کند. همانطور که در شکل ۴ مشخص است میزان فعالیت متابولیک در ساعت های ۴۸ و ۷۲ نسبت به کنترل ۲۰٪ و ۲۸٪ کاهش یافت و در ساعت ۹۶ نیز میزان فعالیت متابولیک تا ۳۵٪ نسبت به کنترل کاهش داشت (شکل ۴). جهت بررسی تاثیر ورود وکتور و بیان ژن GFP بروی فعالیت



شکل ۱. بررسی کمی و کیفی میزان ورود وکتور لنتی ویروسی به داخل سلول های Reh
(A) جهت بررسی کمی میزان ورود وکتور از فلوسایتمتری و خاصیت فلورسانت GFP استفاده شد. (B) جهت بررسی کیفی میزان سلول های GFP مثبت از میکروسکوپ اینورت فلورسنت استفاده شد.

بیان ژن آپوپتین وابسته به زمان باعث کاهش شمارش سلول های Reh می شود:
جهت بررسی میزان تاثیر ورود LV-GFP-Apoptin بر روی پرولیفراسیون سلولی Reh از تست تریپان بلو استفاده کردیم. نتایج حاکی از آن است که افزایش بیان آپوپتین در سلول های Reh بعد از ۴۸ ساعت وابسته به زمان در ساعت های ۷۲، ۹۶ باعث کاهش چشمگیر میزان تکثیر سلول ها نسبت به کنترل می شود (شکل ۳). بررسی درصد زنده ماندن سلول ها نشان داد که در ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۷۰٪، ۶۲٪ ($p \leq 0.01$) و ۵۳٪ ($p \leq 0.01$) سلول ها زنده هستند.

به علاوه، بررسی‌های صورت گرفته توسط MTT assay نیز نشان داد که ترانسداکت ژن آپوپتین در سلول‌های Reh منجر به کاهش میزان فعالیت متابولیک سلولی می‌گردد، در مطالعه Guelen و همکاران نیز تاثیر بیان آپوپتین بر القاء آپوپتوز در رده‌های سلولی Saos-2 و HSC-3 مشخص شد (۱۲). تاثیر مهاری بیان ژن آپوپتین ناشی از خود وکتور ویروسی و بیان ژن GFP نبوده و وکتور لنتی ویروسی بدون آپوپتین تاثیر ناچیزی بر روی درصد زنده‌مانی سلول‌ها و فعالیت متابولیک داشته است (۶).

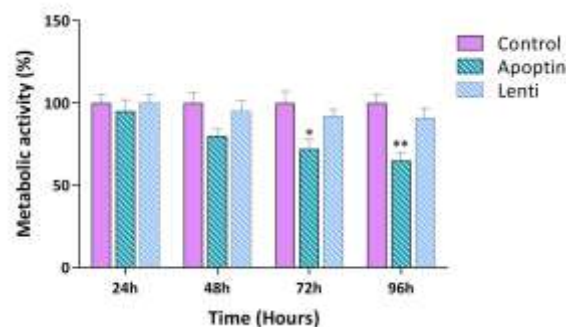
به طور کلی، نتایج بدست آمده در تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که وکتور-های لنتی ویروسی یکی از موثرترین روش‌ها برای انتقال ژن می‌باشد و ژن آپوپتین نیز یک ژن موثر در القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است (۱۶-۱۳). مطالعات بالینی و ژنتیکی صورت گرفته بر روی مکانیسم‌های پاتوژن ALL اعلام می‌کنند که مسیر PI3K/Akt در بیش از ۸۰ درصد از موارد لوسمی لنفوبلاستیک حاد فعال می‌باشد. این تحقیقات نشان می‌دهند که فعالیت این مسیر انتقال پیام، نه تنها باعث تقویت پتانسیل تکثیری سلول‌های لوسمیک می‌شود؛ بلکه تاثیر بسزایی در ایجاد مقاومت نسبت داروهای شیمی درمانی نیز می‌گذارد. نتایج بدست آمده در تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که آپوپتین وابسته به مسیر PI3K/Akt و با تجمع Akt در هسته باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۷ و ۱۸). نتایج ما در این پژوهش نشان داد که در سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Reh، که مسیر PI3K/Akt در آن فعال است باعث کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود. همین ویژگی انتقال آپوپتین به سلول‌های سرطانی لنفوبلاستیک می‌تواند بدلیل فعالیت دائمی مسیر PI3K باعث القاء مرگ سلولی در این سلول‌ها شود. علاوه بر این آپوپتین به عنوان یک ژن با منشأ ویروسی هیچ مهارکننده شناخته شده‌ای در سلول‌های انسانی ندارد و افزایش بیان آن در سلول‌های سرطانی موجب افزایش جبرانی مهارکننده‌های آن نمی‌شود. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد یکی از بهترین روش‌ها برای انتقال ژن به داخل سلول‌های سرطان خون که مقاومت بالایی به وکتورها دارند استفاده از وکتور لنتی ویروسی است.

در این پژوهش پس از انتقال ژن آپوپتین بوسیله وکتور لنتی ویروسی میزان بیان ژن آپوپتین وابسته به زمان افزایش یافت و بیان این ژن منجر به کاهش قدرت تکثیر و درصد زنده‌مانی سلول‌ها شد. علاوه بر این بررسی تاثیر بیان آپوپتین بر فعالیت متابولیک سلولی نشان دهنده نقش آن در کاهش فعالیت متابولیک است. به همین دلیل شاید بتوان در آینده از بیان این ژن برای ایجاد حساسیت در سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای شیمی درمانی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تامین بودجه تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

متابولیک وکتور لنتی ویروسی بدون ژن آپوپتین نیز با سلول مجاور شد که مقایسه تاثیر آن با کنترل نشان دهنده تاثیر ناچیز وکتور و بیان ژن GFP در کاهش فعالیت متابولیک در ساعت‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ می‌باشد.



شکل ۴. بررسی مجاورت LV-GFP-Apoptin بر فعالیت متابولیک سلول‌ها. نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن آپوپتین در سلول‌های Reh موجب کاهش فعالیت متابولیک در ساعت‌های ۴۸، ۷۲، ۹۶ می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean±SD) محاسبه و p-value به دست آمده (**، بیانگر $p < 0.01$) نشانگر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که LV-GFP-Apoptin دارای فعالیت ضد توموری در سلول‌های Reh می‌باشد و بیان این ژن در سلول‌های لوسمی مانع تکثیر سلولی و القاء کننده مرگ سلولی است. چندین روش برای بیان پروتئین در داخل سلول وجود دارد که استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی یکی از بهترین روش‌ها برای انتقال ژن به داخل سلول‌های لنفوسیتی بدلیل مقاومت بالای این نوع سلول‌ها به وکتورهای دیگر است. نتایج حاصل از بررسی میزان بالای فلورسانس GFP نشان از عملکرد مناسب LV-GFP-Apoptin در ورود به سلول‌های Reh دارد. این نتایج با یافته‌های پژوهشی که توسط Jie Jiang و همکارانش انجام شد مطابقت داشته که در آن با استفاده از وکتور لنتی ویروسی ژن آپوپتین توانسته بود میزان بالای از سلول‌های میلومایی را آلوده کند (۱۱).

علاوه بر این میزان بیان ژن آپوپتین توسط Real Time PCR اندازه-گیری شد و نتایج نشانگر آن بود که بیان ژن آپوپتین در سلول‌های Reh افزایش چشمگیری داشته است. به منظور بررسی تاثیر سایتوتوکسیک بیان ژن آپوپتین در سلول‌های Reh تست تریپان بلو انجام شده و نتایج نشان می‌دهند که آپوپتین وابسته به زمان، نه تنها می‌تواند از میزان تکثیر سلول‌های Reh بکاهد؛ بلکه می‌تواند درصد زنده‌مانی سلول‌ها را نیز کاهش دهد بطوریکه کاهش در میزان بقاء سلول‌ها از ۴۸ ساعت شروع و در ۹۶ ساعت به حداکثر میزان رسید. مطالعات قبلی نیز به تاثیر سایتوتوکسیک بیان این ژن در سرطان‌های سینه و کبد اشاره کرده‌اند.

Design of Lentiviral Vector of Apoptin and Investigating its Cytotoxic Effect on Reh Acute Lymphoblastic Leukemia Cells

A.A. Najmedini (MSc)¹, R. Vahabpour (PhD)², F. Jalali (MD)³, D. Bashash (PhD)^{1*}

1.Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

2.Department of Medical Lab Technology, Faculty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

3.Bam University of Medical Sciences, Bam, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(5); May 2018; PP: 48-53

Received: Apr 10th 2018, Revised: Jan 24th 2018, Accepted: Feb 11th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Resistance to chemotherapy drugs is one of the most important treatment problems in patients with acute lymphoblastic leukemia. Apoptin due to its ability to induce apoptosis in tumor cells, has an undeniable potential in cancer treatment, especially those that respond lessly to chemotherapy. Therefore, in this study, the effect of induction of apoptin expression on induction of cell death in reh malignant lymphoblasts was investigated.

METHODS: In this experimental study, after culturing of Reh cells (prepared by the Pasteur Institute), the entry of lentiviral vector, metabolic activity and cell proliferation were measured using flow cytometry, MTT and trypan blue at 24, 48, 72 and 96 hours. Real time PCR was also used to determine the apoptin gene expression.

FINDINGS: The results of this study indicate the design and construction of a suitable lentiviral vector that can infect more than 65% of the cells. Also, after infecting the cells with the vector, the apoptin gene expression rate was increased about 10 times to control, and subsequently, the cell viability decreased by 53% time-dependently ($p < 0.01$). The results also showed that the inhibitory effect of apoptin gene expression on the metabolic activity of Reh cells was about 35% ($p < 0.01$).

CONCLUSION: The results of the study showed that apoptin gene expression has anti-tumor activity in Reh cells and can be used as a promising therapy in ALL.

KEY WORDS: *Apoptin, Lentiviral Vector, Acute Lymphoblastic Leukemia, Reh Cell Li.*

Please cite this article as follows:

Najmedini AA, Vahabpour R, Jalali F, Bashash D. Design of Lentiviral Vector of Apoptin and Investigating its Cytotoxic Effect on Reh Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(5):48-53.

*Corresponding Author; D. Bashash (PhD)

Address: Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +98 21 22717504

E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

References

- 1.Zhou Y, You MJ, Young KH, Lin P, Lu G, Medeiros LJ, et al. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. *Hum Pathol*. 2012;43(9):1347-62.
- 2.Fowler NO, McCall D, Chou TC, Holmes JC, Hanenson IB. Electrocardiographic changes and cardiac arrhythmias in patients receiving psychotropic drugs. *Am J Cardiol*. 1976;37(2):223-30.
- 3.Los M, Panigrahi S, Rashedi I, Mandal S, Stetefeld J, Essmann F, et al. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1793(8):1335-42.
- 4.Yuan L, Zhang L, Dong X, Zhao H, Li S, Han D, et al. Apoptin selectively induces the apoptosis of tumor cells by suppressing the transcription of HSP70. *Tumor Biol*. 2013;34(1):577-85.
- 5.Backendorf C, Noteborn MH. Apoptin towards safe and efficient anticancer therapies. *Anticancer Genes: Springer*; 2014. P. 39-59.
- 6.Ma J-L, Han S-X, Zhao J, Zhang D, Wang L, Li Y-D, et al. Systemic delivery of lentivirus-mediated secretable TAT-apoptin eradicates hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Int J Oncol*. 2012;41(3):1013-20.
- 7.Zhou S, Zhang M, Zhang J, Shen H, Tangsakara E, Wang J. Mechanisms of Apoptin-induced cell death. *Med oncol*. 2012;29(4):2985-91.
- 8.Wang C, Wang W, Wang J, Zhan H, Jiang L, Yan R, et al. Apoptin induces apoptosis in nude mice allograft model of human bladder cancer by altering multiple bladder tumor-associated gene expression profiles. *Tum Biol :J Int Soc Oncodevelopment Biol Med*. 2013;34(3):1667-78.
- 9.Klimatcheva E, Rosenblatt JD, Planelles V. Lentiviral vectors and gene therapy. *Front Biosci*. 1999;4:481-96.
- 10.Amado RG, Chen IS. Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach?. *Science*. 1999;285(5428):674-6.
- 11.Jiang J, Cole D, Westwood N, Macpherson L, Farzaneh F, Mufti G, et al. Crucial roles for protein kinase C isoforms in tumor-specific killing by apoptin. *Cancer Res*. 2010;70(18):7242-52.
- 12.Guelen L, Paterson H, Gaken J, Meyers M, Farzaneh F, Tavassoli M. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells. *Oncogene*. 2004;23(5):1153-65.
- 13.Peng C, Yang P, Cui Y, He M, Liang L, Di Y. HSPA9 overexpression inhibits apoptin-induced apoptosis in the HepG2 cell line. *Oncol Report*. 2013;29(6):2431-7.
- 14.Zhao J, Han SX, Ma JL, Ying X, Liu P, Li J, et al. The role of CDK1 in apoptin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2013;30(1):253-9.
- 15.Taebunpakul P, Sayan BS, Flinterman M, Klanrit P, Gaken J, Odell EW, et al. Apoptin induces apoptosis by changing the equilibrium between the stability of TAp73 and DeltaNp73 isoforms through ubiquitin ligase PIR2. *Apoptosis*. 2012;17(8):762-76.
- 16.Shen Ni L, Allaudin ZN, Mohd Lila MA, Othman AM, Othman FB. Selective apoptosis induction in MCF-7 cell line by truncated minimal functional region of Apoptin. *BMC Cancer*. 2013;13:488.
- 17.Neri L, Cani A, Martelli A, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014;28(4):739-48.
- 18.Maddika S, Wiechec E, Ande SR, Poon IK, Fischer U, Wesselborg S, et al. Interaction with PI3 kinase contributes to the cytotoxic activity of apoptin. *Oncogene*. 2008;27(21):3060-5