

اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک مهار c-Myc توسط 10058-F4 بر سلول های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد

محمد صیادی (PhD)^۱، آوا صفراوغلی آذر (MSc)^۲، داوود بشاش (PhD)^{۳*}

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

دریافت: ۹۸/۱۱/۲۰، اصلاح: ۹۹/۲/۲۸، پذیرش: ۹۹/۷/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: c-Myc نقش بسیار مهمی در کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلول ها بازی می کند. با توجه به دخالت C-Myc در تنظیم طیف گسترده ای از عملکردهای داخل سلولی و بر اساس نقش آن در پاتوژنز لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL)، در این مطالعه با هدف بررسی اثر ضد لوسمی 10058-F4، به عنوان یک مهار کننده شناخته شده C-Myc، در سلول های HL-60 مشتق از APL انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک 10058-F4 در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، رده سلولی HL-60 (تهیه شده از انیستتو پاستور ایران) با دوزهای مختلف مهار کننده (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) تیمار گشته و سپس در فواصل زمانی ۲۴ و ۳۶ ساعت، درصد زنده مانی، شمارش سلولی، فعالیت متابولیک و القاء آپوپتوز به ترتیب بررسی گردید. علاوه بر این، برای بررسی مکانیسم های مولکولی عملکرد 10058-F4 تغییرات رونویسی از ژن های مرتبط با آپوپتوز به کمک روش Real-time PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که مهار c-Myc با استفاده از 10058-F4 در دوزهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار در ۲۴ ساعت به ترتیب موجب کاهش $4 \pm 38\%$ و $3 \pm 49\%$ رشد سلول های HL-60 نسبت به گروه کنترل می گردد ($p < 0.05$). همچنین اثرات سایتوتوکسیک دارو، ناشی از توقف سلول ها در فاز G1 و القاء آپوپتوز می باشد؛ چرا که درصد سلول های رنگ گرفته با Annexine/PI در سلول های تیمار شده با دوز ۱۰۰ میکرومولار پس از ۲۴ ساعت، در مقایسه با گروه کنترل ۳۱٪ افزایش یافته بود ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: در این مطالعه، کارآمدی 10058-F4 در سلول های HL-60 کاملاً مشخص شد.

واژه های کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، c-Myc، 10058-F4، رده سلولی HL-60.

مقدمه

لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، گروهی هتروژن از بدخیمی های خونی است که در آن شاهد تکثیر افسار گسیخته سلول های نئوپلاستیک و تجمع بلاست های متوقف شده در مرحله ای از بلوغ و مقاوم به مرگ سلولی در مغز استخوان هستیم (۱). لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) ۵-۱۵ درصد لوسمی های میلو بلاستیک حاد را به خود اختصاص داده است و قادر است در صورت مقاومت به درمان و یا عود، درصد بالایی از مرگ و میر را برای مبتلایان به این بیماری رقم بزند. یکی از درمان های فعلی برای این بیماری استفاده از ATO (آرسنیک تری اکساید) می باشد که تا حد زیادی پوشش دهنده نقایص داروی ATRA در القاء آپوپتوز و ممانعت از بازگشت مجدد بیماری می باشد (۲). اما در عین حال ATO دارای عوارض جانبی چشمگیری در دوزهای بالا بوده و این دوزها لازمه اثر گذاری آن است (۳). تلاش ها برای گره گشایی از مکانیسم های مولکولی که در پدیده مقاومت

به داروهای شیمی درمانی و بروز عود سرطان نقش دارند، با سرعت بسیار زیادی در حال پیشرفت می باشد و یافته های اخیر در این زمینه نشان می دهند که یکی از مهم ترین ساز و کارهای دخیل در نامیرایی سلول های سرطانی و مقاومت نسبت به آپوپتوز فعالیت انکو پروتئین c-Myc می باشد (۴). c-Myc نقش بسیار مهمی در کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلول ها بازی می کند و بیان نابجای آن در بسیاری از سرطان های انسانی از جمله APL مشاهده می شود (۵). c-Myc با پروتئین دیگری به نام Max دایمر می شود تا بتواند به توالی خاصی بر روی DNA (E-box) به موتیف مرکزی CACGTG در قسمت پروموتور ژن های هدف خود اتصال یابد. بنابراین از طریق مهار کردن دایمریزاسیون c-Myc/Max می توان مانع اتصال c-Myc به DNA و در نتیجه مهار عملکرد آن شد (۶). به دلیل نقش مهم c-Myc در بقای سلول های سرطانی، مهار آن می تواند منجر به

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۹۹۰ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر داود بشاش

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه خون شناسی و بانک خون. تلفن: ۰۲۱-۲۳۷۱۷۵۰۴

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

بررسی فعالیت متابولیک سلول ها با MTT assay: برای ارزیابی تأثیر داروی 10058-F4 بر فعالیت متابولیک سلول های HL-60، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای حاوی و فاقد دارو اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، به سلول های 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 به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری: به منظور بررسی تأثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده، ۵×۱۰^۵ سلول در هرچاهک پلیت ۱۲ خانه ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت های مختلف از داروی 10058-F4 تیمار گردید. پس از شست و شوی سلول ها با بافر فسفات- سالین (PBS) و افزودن معرف های AnnexinV-FITC/PI (Roche، آلمان)، و بافر انکوباسیون، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی رنگ پذیری سلول ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (PartecPasIII) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار Flowjo 7.6.1 صورت گرفت.

بررسی میزان فعالیت چرخه سلولی: سلول های HL-60 در پلیت های ۶ خانه قرار گرفتند. سپس با 10058-F4 برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شده و پس از گذشت زمان انکوباسیون، سلول ها با دور ۲۰۰۰ rpm برای زمان ۵ دقیقه سانتیفریوژ شدند. در ادامه، سلول ها در اتانول ۷۰٪ فیکس شده و در دمای ۲۰ C- به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس ۵۰ μg/ml از محلول RNase در PBS افزوده شده و بعد از افزودن PI به مقدار ۵۰ μg/ml، محتویات DNA سلولی به وسیله فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و آنالیز آن از طریق نمودارهای به دست آمده صورت پذیرفت.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳: برای بررسی این که آیا مرگ سلولی القاء شده توسط 10058-F4 در رده سلولی HL-60 وابسته به کاسپاز می باشد، فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳، توسط کیت کاسپاز ۳ (سیگما، آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمون بر اساس تشخیص اسپکتوفتومتری مولکول p-نیتروانیلین (p-nitroanilim) (pNA) متصل به انتهای سوپسترای اختصاصی کاسپاز می باشد. سلول ها با غلظت های مورد نظر از 10058-F4 و یا به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از زمان مورد نظر و سانتیفریوژ با دور ۶۰۰ g برای مدت ۵ دقیقه، جهت لیز پلت سلولی، بافر لایزات به آن اضافه شد. مجدداً با دور ۲۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید. در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر، ۵ میکروگرم از سوپرناتانت با ۸۵ میکرولیتر بافر assay به همراه ۱۰ میکرولیتر از سوپسترای کاسپاز ۳ به مدت ۲ ساعت در پلیت ۹۶ خانه انکوبه شد. شکست پپتید توسط کاسپاز ۳ منجر به آزاد شدن رنگ pNA می شود که با کمک اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۰۵ nm قابل اندازه گیری می باشد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: پس از تیمار سلول ها با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار 10055-F4، استخراج RNA پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از تریزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش

تحلیل و از بین رفتن سلول های توموری شود. با توجه به ویژگی های انکوژنیک C-Myc، امروزه مهار این ژن در سرطان های مختلف مورد توجه قرار گرفته است و در همین راستا مهارکنندگان متعددی که C-Myc را مورد هدف قرار می دهند ساخته شده اند. در یک نگاه کلی به این مهارکنندگان، می توان گفت مهارکنندگان Myc به دو دسته مستقیم و غیر مستقیم تقسیم می شوند که هر کدام از آنها انواع مختلفی دارند (۷).

10058-F4 طبق دسته بندی فوق از مهارکنندگان مستقیم Myc به شمار می رود (۸). این دارو از هتروداایمریزاسیون c-Myc و Max جلوگیری کرده و در نتیجه از عملکرد آن جلوگیری می کند. تاکنون بررسی های گوناگونی در مورد تأثیر این ترکیب بر روی سلول های سرطانی مختلف صورت گرفته و نشان داده شده است که 10058-F4 موجب مهار تکثیر سلول های سرطانی کبد، پروستات و سینه می شود (۹ و ۱۰). با توجه به عوارض جانبی نگران کننده و نقص های موجود در داروهای فعلی مورد استفاده برای درمان APL و همچنین بیان انکوپروتئین C-Myc در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، لذا به نظر می رسد این بیماران کاندید مناسب برای درمان با مهار کننده C-Myc باشند. به این منظور و برای بررسی کارایی استفاده از استراتژی مهار C-Myc در بیماری APL، سلول های رده HL-60 با غلظت های متفاوت از داروی 10058-F4 تیمار شدند و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت و تیمار سلولی: در این مطالعه تجربی، پس از تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد IR.SBMU.RETECH.REC.1397.1012، سلول های HL-60 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) (تهیه شده از انیستتو پاستور ایران) در محیط کشت RPMI1640 (Gibco، آمریکا) همراه با ۱۰٪ FBS، U/ml، ۱۰۰ پنی سیلین و ۱۰۰ استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار دی اکسیدکربن ۵٪ نگه داری شدند. تیمار سلول های HL-60 با غلظت های مختلف 10058-F4 (۲۰-۵۰ میکرومولار) (Selleckchem, Germany) و در زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت صورت گرفت. در همه آزمایش ها، سلول های HL-60 کشت داده شده در محیط کشت RPMI1640 بدون تیمار با دارو به عنوان گروه کنترل تلقی گردید. تمامی آزمایش ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه گانه انجام شد.

آزمون تریپان بلو: جهت بررسی تأثیر داروی 10058-F4 بر میزان زنده مانی سلول ها، سلول های HL-60 به تعداد ۵×۱۰^۵ cells/ml در حضور دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط گشته، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه انکوبه و پس از آن شمارش شد. سلول هایی که این رنگ را جذب می نمایند، جزو سلول های مرده و سلول هایی که هیچ رنگی را به خود جذب نکرده اند، زنده محسوب می شوند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده مانی سلول ها محاسبه گردید:

$$\text{میزان زنده مانی (\%)} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times 100$$

سانتی گراد) و مرحله اتصال/ بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می باشد. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز آماری: تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $Mean \pm SD$ قید شدند. بعد از اطمینان از توزیع طبیعی داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک (Shapiro-Wilk) و برابری واریانس ها با استفاده از آزمون لوین (Leven)، به منظور بررسی تغییرات بین گروهی از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey post-hoc test) استفاده گردید. محاسبات با استفاده از نرم افزار SPSS 23 انجام شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه Nanodrop ND ۲۰۰۰ بررسی شد. جهت انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA (Takara، ژاپن) استفاده شد. جهت سنتز cDNA مطابق با پروتکل، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

بررسی کمی بیان ژن های c-Myc، Bax و Bcl-2: برای بررسی کمی بیان ژن های c-Myc، Bax و Bcl-2 آزمون-quantitative Real time RT-PCR انجام شد. از ژن ABL به عنوان ژن Houskeeping در فرآیند سنجش استفاده گردید. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرولیتر SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۷ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه

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

ژن	Accession number	آغازگر معکوس (5'-3')	آغازگر مستقیم (5'-3')	سایز (bp)
ABL	NM_005157	TCCTCGTCTCCAGCTGTTA	ACCCGGAGCTTTTCACCTTT	218
c-Myc	NM_002467	CCACAGCAAACCTCCTCACAG	GCAGGATAGTCCTTCCGAGTG	105
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bcl-2	NM_000633	CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	۲۴۹

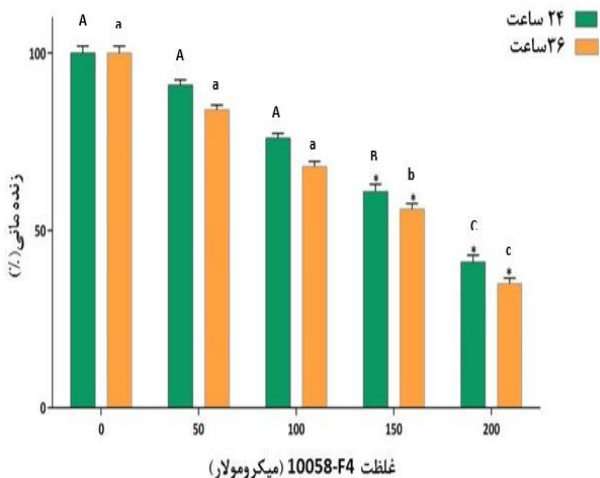
یافته ها

10058-F4 سبب کاهش میزان زنده مانی سلول های HL-60 به صورت وابسته به دوز و زمان می شود: نتایج نشان داد که با افزایش دوز دارو و گذشت زمان، درصد زنده مانی سلول های HL-60 تیمار شده با دارو کاهش می یابد. علی رغم اینکه دوز ۵۰ میکرومولار از 10058-F4 اثر چشم گیری بر میزان زنده مانی سلول های HL-60 نمی گذارد، تیمار ۲۴ ساعته سلول ها با دوزهای بالاتر از این مهار کننده (۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) میزان زنده مانی را به ترتیب به میزان 38 ± 4 و $49 \pm 3/2$ درصد کاهش می دهد (نمودار ۱). به طور کلی، این نتیجه بیانگر اثر سایتوتوکسیک این دارو به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول های رده HL-60 نسبت به گروه کنترل می باشد ($p < 0.05$).

تیمار سلول های HL-60 با داروی 10058-F4 منجر به کاهش میزان تکثیر سلول ها به صورت وابسته به دوز و زمان می شود: نتایج حاصل از شمارش سلول های زنده بعد از مواجهه با داروی 10058-F4 با آنکوباسیون به مدت زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت نشان داد که این مهار کننده دارای اثرات ضد تکثیری روی سلول های مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می باشد. در مقایسه با گروه کنترل، تیمار سلول ها با دوزهای مختلف داروی 10058-F4 باعث شد تا شمارش سلول های زنده کاهش یابد (نمودار ۲). لازم به ذکر است که در تأیید نتایج به دست آمده از بررسی میزان زنده مانی سلول ها، داروی 10058-F4 در دوز ۲۰۰ میکرومولار پس از ۳۶ ساعت تعداد سلول ها به 14000 ± 37000 رسیده است که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار می باشد ($p < 0.05$) و در بین دوزهای استفاده شده بیشترین اثر را در کاهش تعداد سلول ها از خود نشان می دهد.

10058-F4 فعالیت متابولیک سلول های HL-60 را کاهش می دهد: فعالیت متابولیک سلول های پرومیلوسیتی که با تست MTT ارزیابی گردید، به صورت وابسته به دوز و زمان در مواجهه با دارو کاهش یافت. تیمار سلول ها با بالاترین دوز

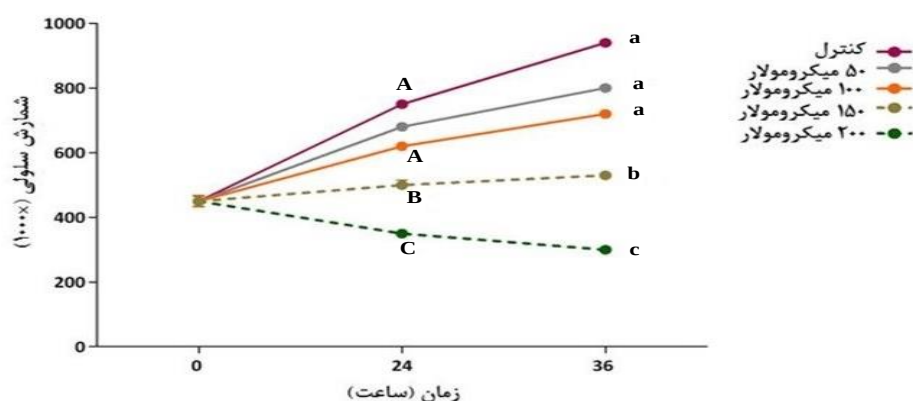
دارو (۲۰۰ میکرومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان $63 \pm 3\%$ کاهش می دهد ($p < 0.05$) (نمودار ۳). به علاوه، اثر مهارى با گذشت زمان بیشتر نیز می شود؛ به طوریکه پس از گذشت ۳۶ ساعت از تیمار سلول ها با دوز ۲۰۰ میکرومولار، فعالیت متابولیک سلول های HL-60 به میزان $76 \pm 4\%$ کاهش یافت ($p < 0.05$) (نمودار ۳).



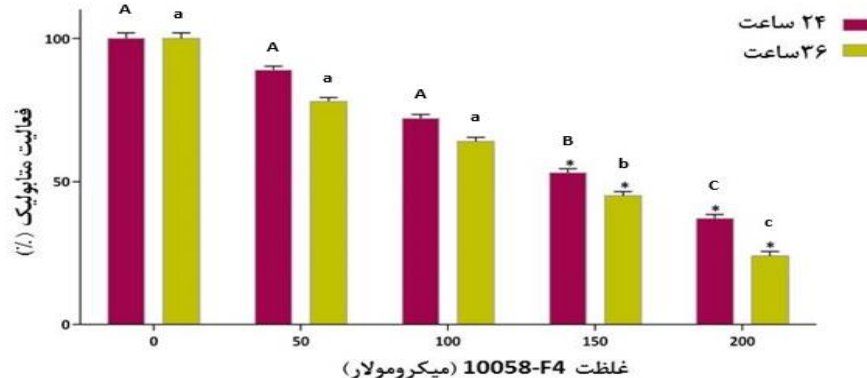
نمودار ۱. تأثیر داروی 10058-F4 بر میزان زنده مانی سلول های HL-60
سلول ها با دوزهای مختلف 10058-F4 برای مدت زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار شدند سپس میزان زنده مانی سلول ها به وسیله آزمون تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. (حروف بزرگ برای زمان ۲۴ ساعت و حروف کوچک برای زمان ۳۶ ساعت در نظر گرفته شده است)

می نماید. جهت بررسی این که آیا آپوپتوز القاء شده توسط مهار کننده c-Myc از طریق فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ صورت می گیرد، سلول های HL-60 با دوزهای مشابهی که برای آزمون Annexin/PI assay استفاده شده بود، تیمار گردید و پس گذشت ۲۴ ساعت میزان فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ توسط کیت Caspase-3 assay مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون نیز نشان داد که مهار c-Myc در سلول های HL-60 با فعال شدن وابسته به دوز آنزیم کاسپاز ۳ همراه است (نمودار ۴) و احتمالاً مهار کننده c-Myc، آپوپتوز را در این رده سلولی از طریق مسیرهای وابسته به کاسپاز فعال می نماید.

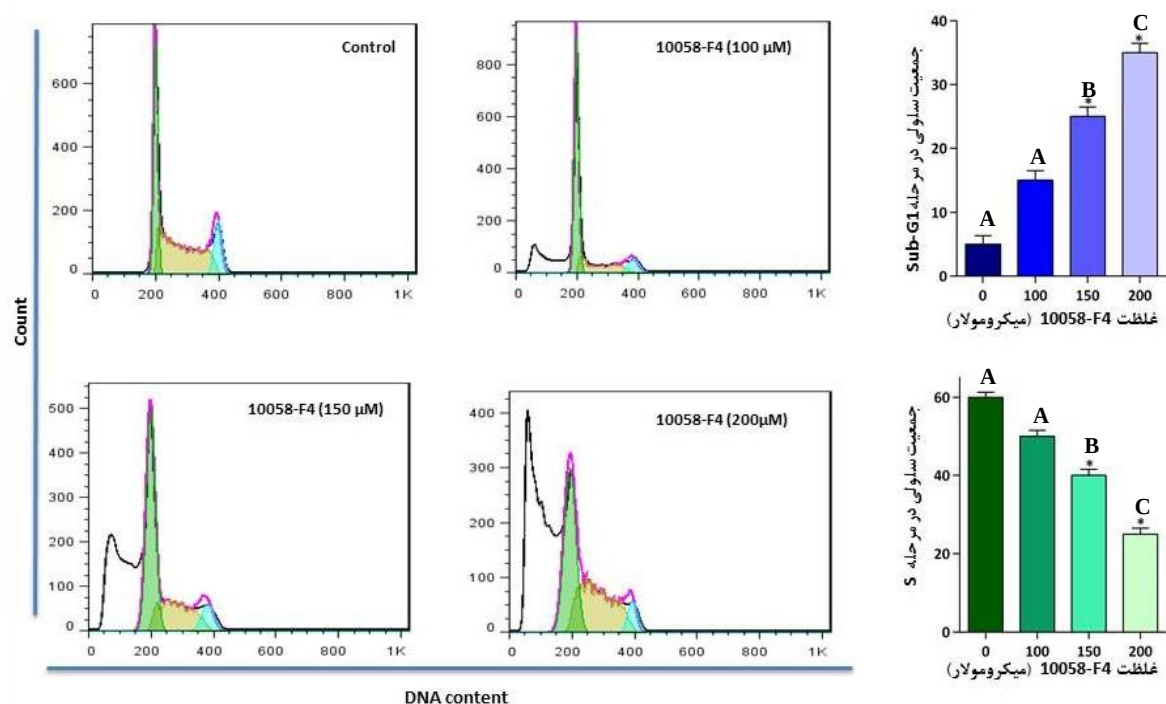
افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 به دنبال تیمار رده سلولی HL-60 با 10058-F4: نتایج حاصل از آزمون quantitative Real time RT-PCR حاکی از آن است که تیمار سلول های HL-60 با 10058-F4 با افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک c-Myc و Bcl-2 همراه می باشد. به دلیل افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول های مواجه شده با دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار نسبت به سلول های کنترل با افزایش همراه بوده است که خود را با افزایش میزان آپوپتوز نشان داده است (نمودار ۶).



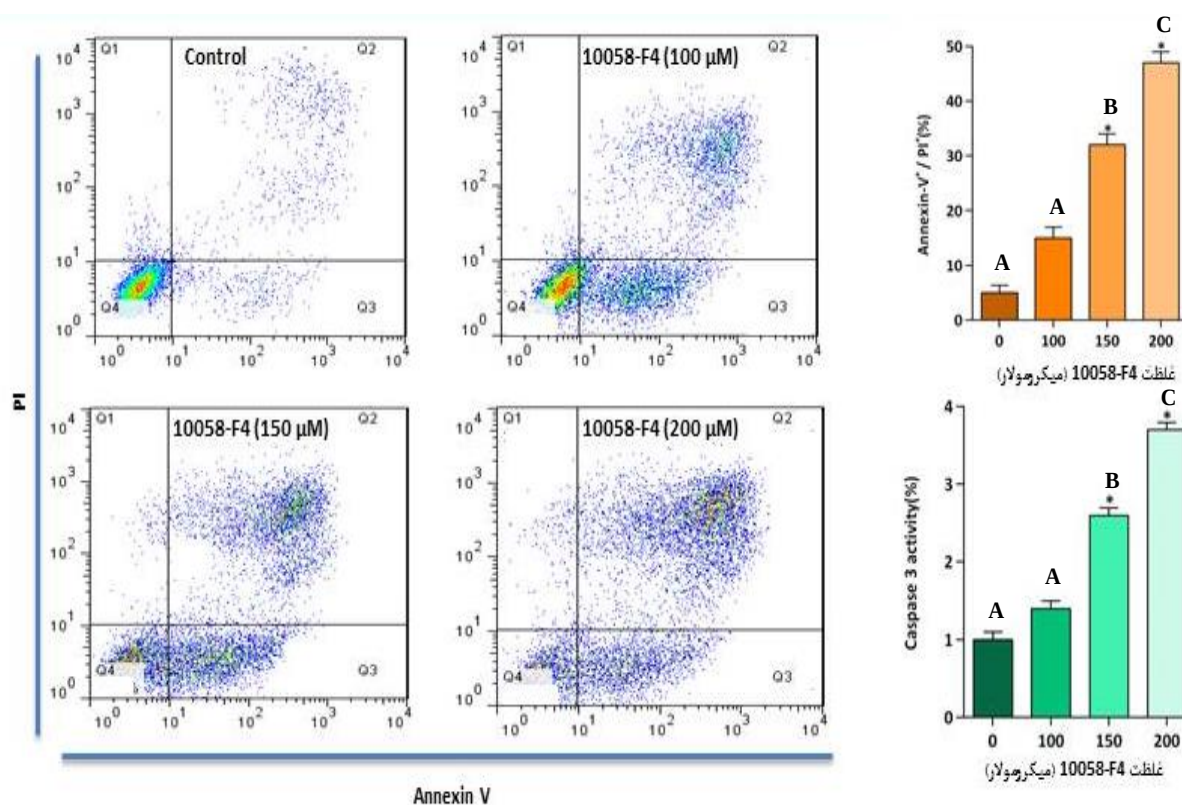
نمودار ۲. تأثیر وابسته به دوز و زمان داروی 10058-F4 بر شمارش سلولی در سلول های HL-60. سلول های HL-60 به تعداد 5×10^5 با غلظت های ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار از 10058-F4 تیمار شدند. همان گونه که در شکل مشاهده می شود تیمار با 10058-F4 به صورت وابسته به دوز و زمان شمارش سلولی را کاهش داده است. (حروف بزرگ برای زمان ۲۴ ساعت و حروف کوچک برای زمان ۳۶ ساعت در نظر گرفته شده است).



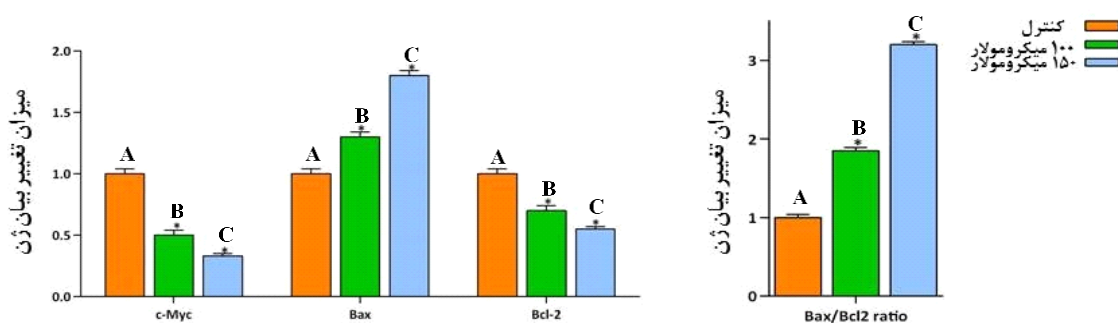
نمودار ۳. بررسی تأثیر داروی 10058-F4 بر فعالیت متابولیک سلولی HL-60. سلول ها در محیط حاوی دوزهای مختلف 10058-F4 برای مدت زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT برای آنها انجام شد. میزان IC_{50} در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۱۵۰ میکرومولار در طی ۳۶ ساعت تخمین زده می شود. (حروف بزرگ برای زمان ۲۴ ساعت و حروف کوچک برای زمان ۳۶ ساعت در نظر گرفته شده است).



نمودار ۴. تاثیر 10058-F4 بر نحوه توزیع سلول های HL-60 در مراحل مختلف چرخه سلولی. نتایج فلوسایتومتری بررسی نحوه توزیع سلول های تیمار شده با مهار کننده نشان داد که داروی 10058-F4 باعث افزایش سلول ها در فاز G1 و Sub-G1 چرخه سلولی می گردد.



نمودار ۵. بررسی درصد جمعیت سلول های آپوپتوز شده پس از تیمار با دوزهای مختلف 10058-F4. تیمار سلول های HL-60 با مهار کننده c-Myc باعث افزایش درصد جمعیت هر دو سلول های Ann-V⁺ و Ann-V⁺/PI⁺ می شود. اتقاء آپوپتوز و فعالیت آنزیماتیک کاسپاز ۳ در رده سلولی HL-60 پس از تیمار با 10058-F4 مورد ارزیابی قرار گرفت.



نمودار ۶. افزایش میزان رونویسی از ژن پروآپتوتیک Bax و کاهش سطح mRNA ژن آنتی آپتوتیک Bcl-2 و c-Myc طی تیمار ۲۴ ساعته سلول های HL-60. سلول ها با دوزهای ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار 10058-F4 برای مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار شدند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن های مورد نظر تحت آزمون Real-time PCR قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری

تمامی نتایج به دست آمده از این بررسی، تأییدکننده تأثیرگذاری داروی 10058-F4 (که نوعی مهارکننده c-Myc است) به عنوان یک داروی سایتوتوکسیک و آنتی پرولیفراتیو برای سلول های HL-60 مشتق از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد می باشد. انکوژن c-Myc به عنوان یک فاکتور رونویسی مهم در بسیاری از فعالیت های فیزیولوژیک درون سلولی همچون تنظیم چرخه سلولی، پرولیفراسیون، تکثیر، بقا، آپوپتوز، رونویسی، ترجمه و متابولیسم سلولی نقش دارد. به طور مثال، c-Myc یکی از تنظیم کننده های اصلی ژن hTERT، از واحدهای کاتالیتیک آنزیم ریورس ترنس کریپتاز انسانی، می باشد که سبب افزایش بیان و فعالیت hTERT و در نتیجه تکثیر و بقای سلول های سرطانی می شود (۱۱). نتایج حاصل از تست های تریپان بلو و MTT نشان دادند، با افزایش دوز و زمان تیمار سلول ها با دارو، تکثیر سلولی و فعالیت متابولیک به شکل معنی داری کاهش می یابد؛ چنانچه دوز ۲۰۰ میکرومولار 10058-F4، ۲ تا ۳ برابر دوز ۵۰ میکرومولار از همین دارو موجب کاهش فعالیت متابولیک و تعداد سلول های زنده گشته است. همچنین دوز ۱۵۰ میکرومولار مهار کننده c-Myc با گذشت زمان از ۲۴ ساعت به ۳۶ ساعت میزان فعالیت متابولیک را از ۵۳٪ به ۴۴٪ کاهش داد. در مطالعه ای که توسط Lin و همکاران انجام شد در سل لاین های کارسینومای هیپاتوسلولار 10058-F4 باعث القای آپوپتوز از طریق فعال سازی مسیر میتوکندریایی شده است (۱۲).

همچنین، در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که مهار عملکرد c-Myc از طریق کاهش سطح ROS به طور قابل توجهی تکثیر سلول های سرطانی تخمدان را کاهش می دهد (۱۳ و ۱۴). اگرچه خاصیت ضد سرطانی c-Myc در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است اما تعداد پژوهش هایی که تمرکز دقیقی بر روی مکانیسم مولکولی این مهار کننده داشته باشند، محدود می باشد (۱۳). فرار از مرگ برنامه ریزی شده سلولی، یکی از راه های بقای سلول های توموری و ایجاد مقاومت دارویی در بیماران است. از جمله نشانه های سلول آپوپتوز شده می توان به جوانه زدن غشاء، کوچک شدن سلول، قطعه قطعه شدن هسته، فشردگی کروموزوم، تکه تکه شدن DNA و همچنین افزایش بروز فسفاتیدیل سرین بر سطح خارجی سلول اشاره کرد (۱۴). برای ارزیابی میزان القاء آپوپتوز به واسطه تیمار سلول ها با 10058-F4، بروز سطحی فسفاتیدیل سرین با فلوسایتمتری بررسی شد که نتایج

حاصله تأییدکننده این مطلب بود. به طوریکه میزان سلول های آپوپتوز شده در دوز ۲۰۰ میکرومولار از دارو به ۶۳٪ رسید. با توجه به مرتبط بودن مسیر c-Myc در پیشبرد تکثیر و چرخه سلولی انتظار می رود مهار آن موجب تغییراتی در این فرآیندها گردد. نتایج حاصل نشان داد که داروی 10058-F4 می تواند با مهار فعالیت متابولیک سلول ها و نگه داشتن آنها در Sub-G1 چرخه سلولی، علاوه بر کاهش تکثیر سلولی موجب فعال شدن مکانیسم های آپوپتوز در این رده سلولی شود. تعداد زیادی از پروتئین ها در پروسه آپوپتوز دخیل هستند که دو پروتئین Bax و Bcl-2 از جمله مهم ترین آنها می باشند که به طور مسقیم و یا غیر مستقیم توسط c-Myc تنظیم می گردد (۱۵).

بر خلاف Bax که پروتئینی پروآپتوتیک می باشد، Bcl-2 آنتی آپتوتیک بوده و کاهش آن سبب راه اندازی مسیر آپوپتوز می گردد. در نتیجه بر هم خوردن توازن بین این دو پروتئین، یعنی افزایش Bax نسبت به Bcl-2 انتظار می رود که سلول به سمت آپوپتوز پیش روی نماید (۱۶). با توجه به آنکه در این مطالعه پس از تیمار سلول های توموری HL-60 با دوز ۱۵۰ میکرومولار میزان بیان Bax معادل ۳/۲۱ برابر میزان بیان Bcl-2 گشت، احتمال می رود که داروی 10058-F4 از طریق تغییر بیان این ژن ها سلول های رده لوسمی پرومیلوسیتیک حاد را به سوی مرگ سلولی سوق داده باشد.

از مجموع اطلاعات حاصل از این پژوهش می توان چنین برداشت کرد که مهار c-Myc با استفاده از داروی 10058-F4 می تواند منجر به القاء آپوپتوز در سلول های توموری HL-60 شده و به دنبال آن از میزان تکثیر و بقای این سلول ها بکاهد. این امیدواری وجود دارد که با وجود عوارض جانبی بسیار اندک از 10058-F4 به عنوان دارویی جدید در عرصه درمان بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد بتوان استفاده کرد. البته بدهی است همچنان نیاز به بررسی بیشتر در رابطه با چگونگی عملکرد و تأثیرات بالینی این دارو در درمان این بدخیمی وجود دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تأمین بودجه تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

Cytotoxic and Apoptotic Effects of C-Myc Inhibition by 10058-F4 on Acute Promyelocytic Leukemia Cells

M. Sayyadi (PhD)¹, A. Safaroghli-Azar (MSc)², D. Bashash (PhD)^{*2}

1.Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

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

J Babol Univ Med Sci; 23; 2021; PP: 150-157

Received: Feb 9th 2020, Revised: May 17th 2020, Accepted: Oct 10th 2020.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: C-Myc plays a very important role in controlling cell proliferation, apoptosis and differentiation. Due to the involvement of c-Myc in the regulation of a wide range of intracellular functions and based on its role in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia (APL), the present study was conducted to investigate the anti-leukemia effect of 10058-F4, as a known c-Myc inhibitor, on APL-derived HL-60 cells.

METHODS: In this experimental study, to evaluate the cytotoxic effects of 10058-F4 in acute promyelocytic leukemia, HL-60 cell line (prepared from Pasteur Institute of Iran) was treated with different doses of inhibitor (50, 100, 150 and 200 μ M) and then in 24 -and 36- hours intervals, survival rate, cell count, metabolic activity and induction of apoptosis were respectively evaluated. In addition, transcriptional changes of apoptosis-related genes were studied by real-time PCR to investigate the molecular mechanisms of function of 10058-F4.

FINDINGS: The results showed that inhibition of c-Myc by 10058-F4 at doses of 150 and 200 μ M in 24 hours reduced the growth of HL-60 cells by $38 \pm 4\%$ and $49 \pm 3.2\%$, respectively, compared to the control group ($p < 0.05$). In addition, the cytotoxic effects of the drug are due to the arrest of cells in the G1 phase and the induction of apoptosis; Because the percentage of cells stained with Annexin V/PI in cells treated at a dose of 100 μ M after 24 hours increased by 31% compared to the control group ($p < 0.05$).

CONCLUSION: In this study, the efficacy of 10058-F4 in HL-60 cells was fully established.

KEY WORDS: Acute Promyelocytic Leukemia, C-Myc, 10058-F4, HL-60 Cell Line.

Please cite this article as follows:

Sayyadi M, Safaroghli-Azar A, Bashash D. Cytotoxic and Apoptotic Effects of C-Myc Inhibition by 10058-F4 on Acute Promyelocytic Leukemia Cells. J Babol Univ Med Sci. 2021; 23: 150-7.

***Corresponding Author: D. Bashash (PhD)**

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

Tel: +98 21 22717504

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

References

1. Bullinger L, Döhner K, Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-46.
2. Razani E, Bayati S, Safaroghli Azar A, Bashash D, Ghafari AH. Anti-cancer effect of aprepitant on Nb4 leukemic cells. *J Babol Univ Med Sci*. 2017;19(10):28-34. [In Persian]
3. Cicconi L, Fenaux P, Kantarjian H, Tallman M, Sanz MA, Lo-Coco F. Molecular remission as a therapeutic objective in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(8):1671-8.
4. Bashash D, Sayyadi M, Safaroghli-Azar A, Sheikh-Zeineddini N, Riyahi N, Momeny M. Small molecule inhibitor of c-Myc 10058-F4 inhibits proliferation and induces apoptosis in acute leukemia cells, irrespective of PTEN status. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;108:7-16.
5. Ding Y, Wang Z-c, Zheng Y, Hu Z, Li Y, Luo D-f, et al. C-Myc functions as a competing endogenous RNA in acute promyelocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(35):56422-30.
6. Pérez-Olivares M, Trento A, Rodríguez-Acebes S, González-Acosta D, Fernández-Antorán D, Román-García S, et al. Functional interplay between c-Myc and Max in B lymphocyte differentiation. *EMBO Rep*. 2018;19(10):e45770.
7. Petrich AM, Nabhan C, Smith SM. MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer*. 2014;120(24):3884-95.
8. Kleszcz R, Paluszczak J, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. The inhibition of c-MYC transcription factor modulates the expression of glycolytic and glutaminolytic enzymes in FaDu hypopharyngeal carcinoma cells. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(6):735-42.
9. Riyahi N, Safaroghli-Azar A, Sheikh-Zeineddini N, Sayyadi M, Bashash D. Synergistic Effects of PI3K and c-Myc Co-targeting in Acute Leukemia: Shedding New Light on Resistance to Selective PI3K- δ Inhibitor CAL-101. *Cancer Invest*. 2019;37(7):311-24.
10. Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. *BMC Cancer*. 2010;10:248.
11. Sheikh-Zeineddini N, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Riyahi N, Manafi Shabestari R, Janzamin E, et al. Suppression of c-Myc using 10058-F4 exerts caspase-3-dependent apoptosis and intensifies the antileukemic effect of vincristine in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):14004-16.
12. Lin C-P, Liu J-D, Chow J-M, Liu C-R, Liu HE. Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 2007;18(2):161-70.
13. Wang J, Ma X, Jones HM, Chan LL-Y, Song F, Zhang W, et al. Evaluation of the antitumor effects of c-Myc-Max heterodimerization inhibitor 100258-F4 in ovarian cancer cells. *J Transl Med*. 2014;12(1):226.
14. Cory S. Phosphatidylserine hide-and-seek. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(48):12092-4.
15. Lin X, Sun R, Zhao X, Zhu D, Zhao X, Gu Q, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(1):53-67.
16. Sadri MR, Safaroghli Azar A, Kazemi AR, Hamidpour M, Allahbakhshian Frasani M, Bashash D. Apoptotic Effect of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition on Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Using Buparlisib. *J Babol Univ Med Sci*. 2017;19(5):7-13. [In Persian]