مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۸، شماره ٤، مهر و آبان ۱۳۸۹
صفحه: ۳۷۹-۳٦۹

Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 18, No. 4, Sep-Oct 2010
Pages: 369-379

تأثیر آدنوزین ´۵تری فسفات در القای آپوپتوز و مهار بیان ژن Survivin و واریانت پیرایشی ضد آپوپتوزی SUR-3B آن در سلول‌های K562

محمد علی حسینپور فیضی[۱]، سید محمد امین موسوی*[۲]، امیر حسین احمدی[۳]، علی موافقی[٤]

۱،۲- استاد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز
۳- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز
۴- دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۱۳

چکیده

مقدمه: لوسمی یک بیماری بدخیم محسوب می‌شود که در آن پیشرفت بیماری در سطح سلول‌های +CD34، اثرات عمده‌ای در مقاومت به دارو و عود مجدد بیماری داشته و همزمان، پروتئین‌های مهار کننده‌ی آپوپتوز (IAPs) نظیر Survivin و نیز پروتئین P-Glycoprotein به عنوان محصول ژن مقاومت به دارو در این سلول‌ها سبب بروز مقاومت به آپوپتوز و در نهایت مقاومت به دارو و شیمی درمانی می‌شود. اخیرا گزارش شده است که آدنوزین ´۵-تری فسفات (ATP) قادر به مهار رشد و القای آپوپتوز در چندین رده‌ی سلولی میلوئیدی می‌باشد که در این میان، رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدلی برای لوسمی میلوئید مزمن (CML) دارای خصوصیات ویژه ای در بیان Survivin و سایر ژن‌های مرتبط با مقاومت دارویی می‌باشد. به همین منظور در مطالعه‌ی حاضر اثر ATP بر رده‌ی سلولی K562 و بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی: رده‌ی سلولی K562 انسانی پس از کشت، تحت تأثیر ATP در غلظت و فواصل زمانی گوناگون قرار گرفت. اثرات ATP بر رشد و زیستایی سلول‌های K562 با استفاده از شمارش سلولی توسط هموسایتومتر و آزمون دفع رنگ تریپان بلو بررسی شد. برای بررسی آپوپتوز میکروسکوپ فلورسانت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شده بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که ATP سبب مهار رشد وابسته به زمان و غلظت و القای آپوپتوز می‌شود. همچنین ATP سبب کاهش بیان ژن Survivin و واریانت ضد آپوپتوزی Sur-3B آن می‌گردد($P<۰/۰۵$). سطح بیان دیگر واریانت‌های پیرایشی (ΔEx3، 2b، 2α و 3α) تغییر معناداری نشان نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر ATP در کاهش بیان Survivin و واریانت پیرایشی Sur-3B و القای آپوپتوز این ترکیب می‌تواند در کنار سایر ترکیبات دارویی برای کاهش مقاومت دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز- مقاومت دارویی- ATP، K562- لوسمی- Survivin

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۳۳۹۲۴۴۳- ۰۴۱۱، پست الکترونیکی: moosav_m@tabrizu.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (CML) به دلیل یک جابجایی دو طرفه بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چند توان، ایجاد می‌شود(۱،۲). انکوژن Bcr-Abl حاصل از این جابجایی، پروتئین p210Bcr-Abl را کد می‌کند که علاوه بر تکثیر بی رویه و مستقل از فاکتور رشد سلول‌های پیش ساز میلوئید، باعث اختلال در مرگ طبیعی و برنامه ریزی شده‌ی (آپوپتوز) آنها نیز می‌شود(۱،۲).

تا کنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، درمان با اینترفرون آلفا، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد(۳). در کنار این راهکارها استفاده از مهار کننده‌های تیروزین کینازی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. کاربرد یکی از این مهار کننده‌ها که به طور اختصاصی Bcr-Abl را مهار می‌کند و ایماتینب مسیلات (Imatinib mesylate) یا STI571 (با نام تجاری Gleevec) نامیده می‌شود، در حال حاضر خط اول درمانی CML محسوب می‌شود(۴). به هر حال استفاده از این مهارکننده‌ها نیز با برخی اثرات جانبی از قبیل مقاومت دارویی همراه است که اشاره به این دارد که هیچ یک از روش‌های درمانی فعلی منجر به درمان کامل CML نگردیده است(۵). این گونه عنوان شده است که علت اصلی مقاومت دارویی وجود مکانیسم‌های مختلف در سطح سلول‌های +CD34 می‌باشد. سلول‌های سرطانی با استفاده از مکانیسم‌های مختلف از جمله تغییر در متابولیسم دارو، کاهش جذب دارو و یا افزایش خارج‌شدن دارو با استفاده از P-گلیکوپروتئین نسبت به داروها مقاومت نشان می‌دهند (۵). یکی دیگر از مکانیسم‌های عمده‌ی مقاومت ذاتی و اکتسابی به دارو مقاومت به آپوپتوز است. بیان بیش از حد پروتئین‌های مهار کننده‌ی آپوپتوز(IAPs) در سلول‌های سرطانی یکی از عوامل اصلی مقاومت آنها به آپوپتوز محسوب می‌شود(۶). Survivin یکی از اعضای خانواده‌ی پروتئین‌های مهار کننده‌ی آپوپتوز به شمار می‌رود که در تنظیم مرگ سلولی و کنترل تقسیم سلولی نقش ایفا می‌کند (۷). علاوه بر Survivin واریانت‌های پیرایشی دیگری نیز از این ژن در سلول‌های مختلف تولید می‌شود که از آن جمله می‌توان به واریانت‌های ΔEx3، 2b، 3b، 2α و 3α اشاره کرد (۷،۸). هر یک از این واریانت‌ها ویژگی‌های خاصی در ارتباط با فرآیند آپوپتوز دارند. به عنوان مثال تاکنون نقش ضدآپوپتوزی برای واریانت پیرایشی ΔEx3 و 3b ونقش پروآپوپتوتیک برای واریانت 2b و 2α گزارش شده است(۷،۸).

یکی از شاخص ترین خصوصیات Survivin بیان بالا و متمایز آن در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی می‌باشد(۶). گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که بیان بالای Survivin در بیماران سرطانی با کاهش طول عمر این بیماران، افزایش احتمال عود بیماری و مقاومت به درمان در ارتباط است(۹). مطالعات صورت گرفته در مبتلایان به CML نیز نشان می‌دهد که Survivin به میزان بالایی در تمامی مراحل بیماری در مقایسه با افراد سالم بیان می‌شود(۹). با توجه به این یافته‌ها هر عاملی که بتواند بیان Survivin و واریانت‌های پیرایشی ضد آپوپتوزی آن را کاهش دهد و سبب القای آپوپتوز شود می‌تواند به عنوان عاملی برای کاستن از مقاومت دارویی و یک راهکار درمانی مؤثر برای مبتلایان به CML مطرح شود(۱۰).

در جستجوی ترکیبی که قادر به القای آپوپتوز و کاهش مقاومت دارویی باشد آدنوزین ۵ٰ- تری فسفات (ATP) می‌تواند به عنوان یکی از کاندیداهای بالقوه مطرح گردد. ATP نه تنها به عنوان یک منبع رایج انرژی برای سلول‌ها محسوب می‌شود بلکه می‌تواند به عنوان یک مولکول پیام رسان بین سلولی ایفای نقش کند و سبب ایجاد پاسخ‌های فیزیولوژیک متنوع در سلول‌های مختلف شود(۱۱). ATP به صورت خارج سلولی می‌تواند از طریق گیرنده‌های سطح سلولی پورینی موسوم به گیرنده‌های P2، سبب راه اندازی مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی و القای اثرات کوتاه مدتی چون ترشح سیتوکین، تجمع پلاکت‌ها، التهاب و موارد بسیار دیگر شود(۱۱). از طرفی ATP می‌تواند در سلول‌های مختلف اثرات بلند مدت مختلفی چون آپوپتوز، تمایز و تکثیر اعمال کند که اشاره به اهمیت این نوکلئوتیدها در فرآیندهایی چون رشد و مرگ سلولی دارد(۱۲). در واقع اثرات ضد سرطانی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

ATP برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط Rapaport نشان داده شد و مطالعات مختلف بیشتر ثابت کرد که ATP سبب مهار همانند سازی DNA و رشد سلولی در رده‌های سلولی سرطان پانکراس، کلون، ملانوما، روده و سینه می‌شود(۱۳). همچنین مطالعات متعددی که بر روی مدل‌های حیوانی صورت گرفته است حاکی از اثر ضد توموری این مولکول در موجود زنده نیز می‌باشد. مطالعات بالینی بر روی انسان نیز نشان می‌دهد که ATP اثرات مؤثری در درمان برخی بیماری‌ها دارد در حالی که هیچ اثر جانبی از آن مشاهده نشده است(۱۲). اهمیت این مطالعه بر این واقعیت استوار است که علی رغم پیشرفت‌های درمانی، CML هنوز یک چالش بزرگ محسوب می‌شود و جستجوی راهکارها و داروهای مختلف در این راستا از الویت‌های تحقیقاتی می‌باشد. لذا مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی ATP بر رده‌ی سلولی K562 به عنوان مدل انسانی CML با تمرکز بر اثرات آن روی بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن به عنوان بازیگرهای مهم در مقاومت دارویی به آپوپتوز پایه گذاری گردید. در واقع سلول K562 یک سلول بنیادی سرطانی است که +CD34 بوده و بیان بالای P-Glycoprotein و مکانیسم‌های مقاومت به آپوپتوز (IAPs) را نشان می‌دهد(۱۴).

روش بررسی

مواد: محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Biosera انگلستان تهیه شد. اسید بوریک، آدنوزین ´۵- تری فسفات (ATP)، رنگ تریپان بلو (Trypan blue)، آکریدین اورنج ((Acridine orange (AO) و اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide (EtBr)) از شرکت Sigma و فلاسک‌های کشت سلول و ظروف ۹۶ و ۲۴ چاهکی استریل از شرکت SPL life science کره جنوبی خریداری شد. برای تست لاتکس از محصول شرکت Gravindex انگلستان استفاده شد. اتیلن دی آمین ترا استیک اسید((Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA))، سدیم دودسیل سولفات ((Sodium dodecyl sulfate (SDS))، تریس (Tris-Hcl) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. RNX-Plus و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین از شرکت سیناژن (تهران-ایران) خریداری شدند. پرایمر Oligo dT و آنزیم MMulV-RT نیز از شرکت Fermentase آلمان خریداری شد.

کشت سلول: رده‌ی سلولی K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI 1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی(FBS) ۱۰٪ و آنتی بیوتیک‌های استروپتومایسین(۱۰۰µg/mL) و پنی سیلین (۱۰۰ U/mL) بود، استفاده گردید. محیط کشت سلول‌ها در محیط استریل و زیر هود مخصوص کشت سلول هر دو روز یکبار مورد تعویض قرار گرفت. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در فلاسک‌های استریل و درانکوباتور مخصوص کشت انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، رطوبت ۹۵٪ و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفت.

بررسی مهار رشد سلولی و زیستایی با استفاده از هموسایتومتر و تریپان بلو: برای این منظور تعداد ۲×۱۰۴ سلول از سلول‌هایی که در پاساژ چهارم خود بودند در هر چاهک در ظروف ۹۶ چاهکی قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت غلظت‌های مختلف از ATP (۵۰ µM تا ۱۰۰۰ µM) به هر چاهک برای زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت اضافه شد. در هر بازه‌ی زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و آزمون تریپان بلو مورد شمارش قرار گرفت.

مطالعه‌ی ریخت شناسی سلول‌های آپوپتوزی: به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌باشد از میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج (AO)/اتیدیوم بروماید (EtBr) استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلولهای زنده رنگ سبز یکنواخت به خود می‌گیرند. سلولهایی که در مراحل اولیه آپوپتوزند (Early Apoptotic)، رنگ سبز به خود می‌گیرند و دارای نقاط روشن سبز در هسته هستند که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند. سلولهایی که در مراحل نهایی آپوپتوزاند (Late Apoptotic) رنگ اتیدیوم بروماید را از خود عبور می‌دهند و بدین ترتیب رنگ نارنجی (Orange) می‌گیرند. در مقایسه با سلولهای آپوپتوز ثانویه که متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته را نشان می‌دهند، سلولهای نکروز شده (Necrotic) نیز به رنگ نارنجی در می‌آیند با این تفاوت که

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

کروماتین آنها متراکم و قطعه قطعه نمی شود. برای انجام این آزمایش صد میکروگرم از هر دو AO و EtBr، بطور جداگانه در ۱ میلی لیتر PBS حل گردید. در هنگام آزمایش نسبت حجمی ۱:۱ از دو محلول تهیه شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (cell/ml ۵×۱۰۵) با ۱ میکرولیتر از محلول EtBr /AO مخلوط و ده میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از تهیه اسمیر سلول ها با لامل پوشانده و با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss-آلمان) مشاهده می‌شود.

آزمون قطعه قطعه شدن DNA: با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA وقوع آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول‌های تیمار شده با اسید بوریک تحت تأثیر بافر لیز کننده [EDTA 10 mM, W/V, Tris-HCl 10 mM, (pH 7.4) SDS 0.1] قرار گرفتند پس از سانتریفوژ DNA با استفاده از ترکیب فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل جداسازی شد. DNA جدا سازی شده با اتانول مطلق و NaCl ۵ مولار به مدت یک شب رسوب داه شد. درنهایت رسوب DNA در بافر 10 mM, TE (Tris-HCl, EDTA 10 mM) حل شد و روی ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ ۱۰ ولت بارگذاری (Load) شد.

استخراج RNA: سلول‌های گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف ATP پس از ۷۲ ساعت برداشت شده و مقادیر یکسان از هر گروه سلول‌ها پس از شستشو جهت استخراج RNR مورد استفاده قرار گرفتند. RNAی کل(Total RNA) با استفاده از محلول RNX-Plus و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (سیناژن- ایران) استخراج شد. به دلیل حساسیت کار با RNA از نظر آلودگی با RNase، جهت غیرفعال سازی این آنزیم کلیه‌ی لوازم مورد استفاده با محلول DEPC(Di Ethyl Pyro Carbonate) ۰/۱ درصد تیمار گردید. کمیت و کیفیت RNAی به دست آمده با روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

تیمار با DNaseI و واکنش رونویسی معکوس (RT) Reverse Transcription: به منظور جلوگیری از آلودگی RNAی حاصله با DNA، ابتدا مقادیر یکسان از RNA اولیه (۱ میکروگرم) مربوط به هر گروه از سلول‌ها با آنزیم DNaseI تیمار و سپس با استفاده از پرایمر oligo dT و طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RT(Germany, Fermentase) به cDNA تبدیل شدند.

طراحی پرایمر: در این تحقیق، ژن β2m به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد. پرایمرهای ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن بر روی اگزون‌های جداگانه طراحی شده‌اند به گونه‌ای که محصول PCR ناشی از آلودگی با DNAی ژنومی به دلیل تفاوت در اندازه‌ی قطعه‌ی تکثیر شده، از محصول اصلی RT-PCR قابل تمایز باشد. شماره دستیابی ژن‌های تحت مطالعه و واریانت‌های پیرایشی مختلف، توالی و جایگاه پرایمرها و طول محصولات PCR در جدول ۱ آورده شده است.

واکنش Nested PCR: واکنش PCR برای ژن Survivin در دو مرحله و با استفاده از پرایمرهای داخلی و خارجی صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده قادر به تکثیر چهار واریانت Survivin، Survivin-ΔEx3، Survivin-2b و Survivin-3b بوده و به ترتیب قطعاتی با طول‌های ۵۵۶، ۴۳۸، ۶۲۵ و ۷۳۱ جفت باز را برای واریانت‌های مذکور به وجود می‌آورند. قابل ذکر است که بیان کم Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن در مرحله‌ی اول PCR قابل آشکارسازی نمی‌باشد.

واکنش Heminested-PCR: این واکنش با استفاده از پرایمر اختصاصی واریانت پیرایشی 3b و در دو مرحله جهت آشکارسازی بیان واریانت پیرایشی 3α، همچنین بررسی دقیق و اختصاصی بیان واریانت پیراشی 3b انجام گرفت. پرایمرهای رفت به کار رفته همان پرایمرهای واکنش قبلی هستند، ولی پرایمر برگشت، اختصاصی واریانت‌های پیرایشی 3b و 3α بوده و این دو واریانت را به طور همزمان تکثیر می‌نماید.

در تمام نمونه‌ها، از ژن β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و واکنش PCR برای هر دو ژن β2m و surviving در تیوب‌های جداگانه و در شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت. برای اطمینان از عدم آلودگی، یک تیوب نیز به عنوان کنترل منفی در هر واکنش به کار رفت که در آن به‌جای cDNA آب دو بار تقطیر استریل استفاده شد. بعد از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از تکثیر بهینه‌ی قطعه‌ی موردنظر، محصول PCR توسط

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید.

تعیین توالی: به منظور تعیین هویت قطعات حاصل از PCR، باندهای مربوط به survivin و واریانت‌های پیرایشی sur-ΔEx3، sur-3b و sur-3α پس از استخراج از ژل، توسط شرکت Microgene (Netherland) تعیین توالی و با توالی موجود در Gene Bank سایت NCBI مقایسه گردید.

نیمه کمی کردن بیان ژن: برای کمی‌سازی بیان ژن، تصاویر مربوط به الکتروفورز ژل آگارز توسط نرم‌افزار Uvidoc مورد بررسی قرار گرفت و پس از تعیین حجم باندها، شاخص بیان ژن در هر نمونه (نسبت حجم باند مذکور به حجم باند β2m) محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: مقایسه‌ی میزان رشد و زیستایی بین سه گروه از سلول‌های تحت تیمار ATP که هر گروه شامل ۵ غلظت متفاوت از ATP می‌شد با سه گروه از سلول‌های تیمار نشده صورت گرفت و از آزمون t-test برای یافتن اختلافات معنادار استفاده شد. در این آزمون داده‌هایی با P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. همچنین برای مقایسه بیان ژن‌ها از آزمون Mann-whitney استفاده شد و داده‌هایی با P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات غلظت‌های متفاوت ATP بر روی رشد سلول‌های K562 با فاصله‌های زمانی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۱-الف بیانگر مهار رشد سلول‌های K562 بعد از یک بار تیمار با ATP با غلظت‌های متفاوت (۵۰ μM تا ۱۰۰۰ μM) برای زمان‌های مختلف می‌باشد. همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود اثرات مهار رشدی ATP بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴ ساعت مشاهده شده و به صورت وابسته به زمان افزایش می‌یابد به طوری که در ۷۲ ساعت به بیشترین میزان خود می‌رسد. به عنوان مثال در غلظت ۱۰۰۰ μM و بعد از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت رشد سلول‌ها به ترتیب به میزان ۳۳/۵٪، ۴۰/۵٪ و ۶۰٪ کاهش می‌یابد. این اثرات همچنین به صورت وابسته به غلظت می‌باشد به طوری که به عنوان نمونه بعد از ۷۲ ساعت تیمار با ATP در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار، رشد سلول‌های K562 به ترتیب به میزان ۲۲٪، ۳۴/۵٪، ۴۰٪، ۴۸٪ و ۶۰٪ مهار می‌شود (شکل ۱- الف).

داده‌های به دست آمده از آزمایش تریپان بلو (شکل ۱-ب) نشان می‌دهد که ATP علاوه بر مهار چشمگیر رشد سلولی، سبب القای مرگ در بین سلول‌های تحت تیمار ATP در هر دو رده‌ی سلولی می‌شود. همانطور که در شکل ۱-ب مشاهده می‌شود زیستایی سلول‌های K562 تحت اثر ATP در ۲۴ ساعت تغییر معناداری نشان نمی‌دهد. این درحالی است که در ۴۸ ساعت زیستایی شروع به کاهش می‌کند ولی در ۷۲ ساعت کاهش چشمگیری به صورت وابسته به غلظت مشاهده می‌شود. به عنوان نمونه میزان زیستایی سلول‌های تحت تیمار با ATP در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار در ۷۲ ساعت به ترتیب به میزان ۱۵٪، ۲۰٪، ۲۵٪، ۳۰٪ و ۴۰٪ در مقایسه با کنترل کاهش می‌یابد.

مطالعات اثرات ATP بر روی سلول‌های K562 با استفاده از رنگ تریپان بلو نشان دهنده‌ی آنست که ATP سبب مرگ سلولی می‌شود (شکل ۱-ب). برای مشخص شدن نوع مرگ سلولی و بررسی این موضوع که آیا ATP سبب القای مرگ به طریق آپوپتوزی می‌شود یا خیر از میکروسکوپ فلوروسنت و تست قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. همان طور که در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت مشخص شد که در میان سلول‌های تیمار شده با ATP پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌هایی با کروماتین سبز یا نارنجی درخشان بسیار فشرده و یا قطعه قطعه دیده می‌شوند که نشان دهنده‌ی مرگ سلولی از نوع آپوپتوز است. همچنین برای اثبات بیشتر موضوع از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. بر اساس نتایج نشان داده شده در شکل ۲- ب، DNAی سلول‌های تیمار شده با ATP به صورت لکه (Smear) بر روی ژل آگارز مشاهده می‌شود در حالی که این حالت در سلول‌های کنترل مشاهده نمی‌گردد. بنابراین این آزمون در کنار داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنت به طور کامل اثبات می‌کند که ATP از طریق آپوپتوز سبب القای مرگ در سلول‌های سرطانی K562 می‌شود.

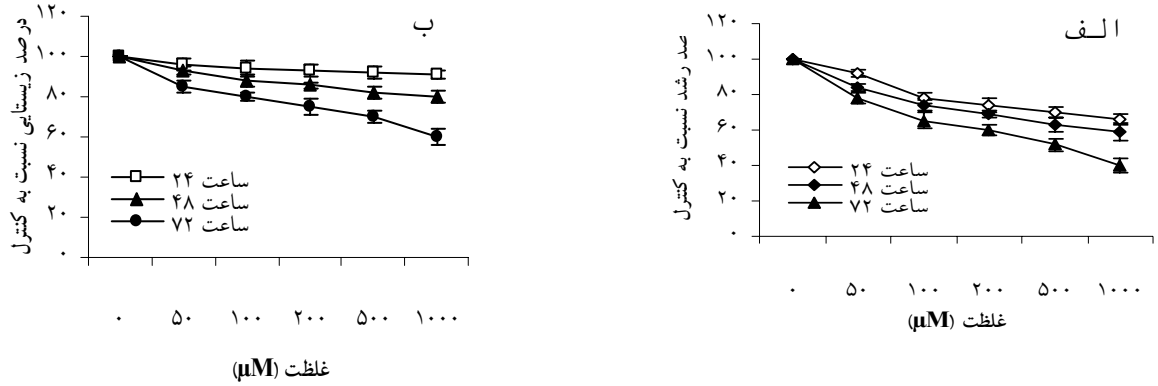
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

به منظور بررسی اثرات ATP بر مقاومت دارویی بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن به عنوان تنظیم گرهای مهم در وقوع پدیده‌ی آپوپتوز مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی نیمه کمی ارتباط رخداد آپوپتوز با بیان ژن Survivin و واریانت‌های پیرایشی آن (شکل ۳-الف و ۳- ب) در ۷۲ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با ATP کاهش وابسته به غلظت بیان ژن Survivin در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل را نشان داد. از طرفی ATP سبب کاهش بیان واریانت پیرایشی ضد آپوپتوزی 3b همگام با کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز در ۷۲ ساعت نیز گردید به طوریکه بیان واریانت پیرایشی 3b در سلول‌های تیمار شده با ATP به طور کلی از بین رفت. همچنین الگوی بیان واریانت پیرایشی ΔEx3 و 3α تغییر مشهودی نشان ندادند. ذکر این نکته ضروری است که واریانت پیرایشی 2b به دلیل بیان ضعیف نه در سلول‌های کنترل و نه در سلول‌های تیمار شده با ATP قابل تشخیص نمی‌باشد(شکل ۴).

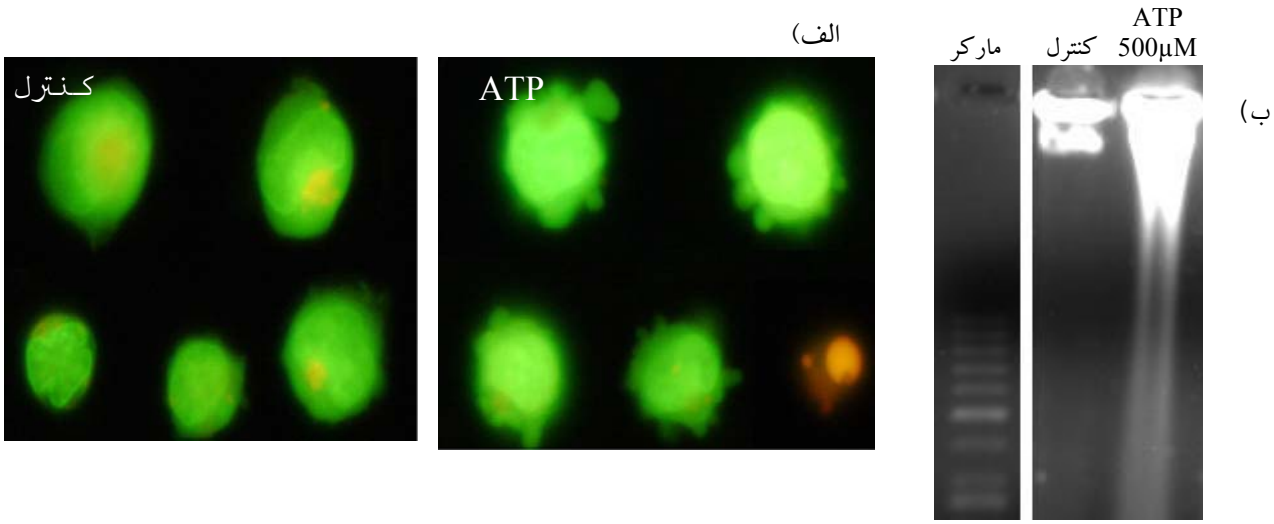
جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن β2m، survivin و واریانت‌های پیرایشی آن

β2m (NM_00114048) size of product: 191 bp
HBF (Human β2m Forward primer): 5'- CTA CTC TCT CTT TCT GGC CTG-3' (94-114)
HBR (Human β2m Reverse primer): 5'- GAC AAG TCT GAA TGC TCC AC-3' (284-265)
Survivin (NM_001168) size of products; Survivin: 556 bp,Survivin-ΔEx3: 438 bp, Survivin-2b: 625 bp
HFP (Human Survivin Forward Primer): 5'-TGG CAG CCC TTT CTC AAG-3 '(149-166)
HRP (Human Survivin Reverse Primer): 5'-GAG AGA GAG AAG CAG CCA C-3' (782-762)
HFPN (Human Forward Primer Nested): 5'-ACC ACC GCA TCT CTA CAT TC- 3'(168-187)
HRPN (Human Reverse Primer Nested): 5'- CTG GTG CCA CTT TCA AGA C -3'(723-705)
Survivin-3b (AB 154416) size of products; Survivin-3b: 420 bp, Survivin-3α: 282 bp
Forward primer: HFP
Nested forward primer: HFPN
Reverse primer:5'-ACA GAC CCT GGC AAA CAT C-3'(429-447)

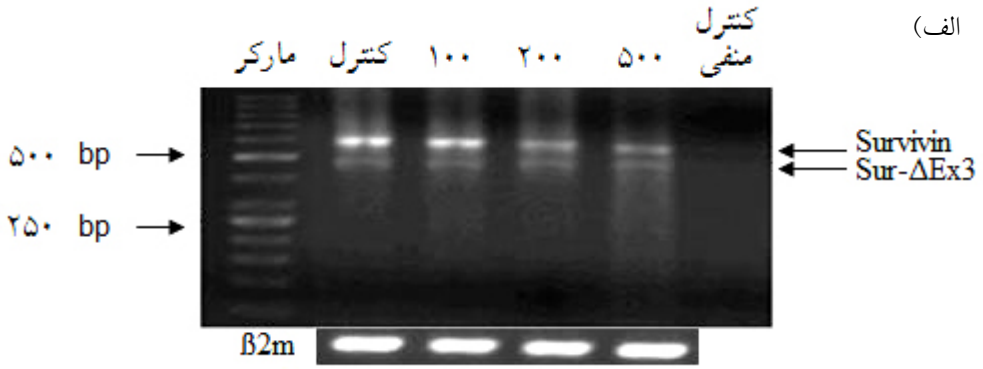


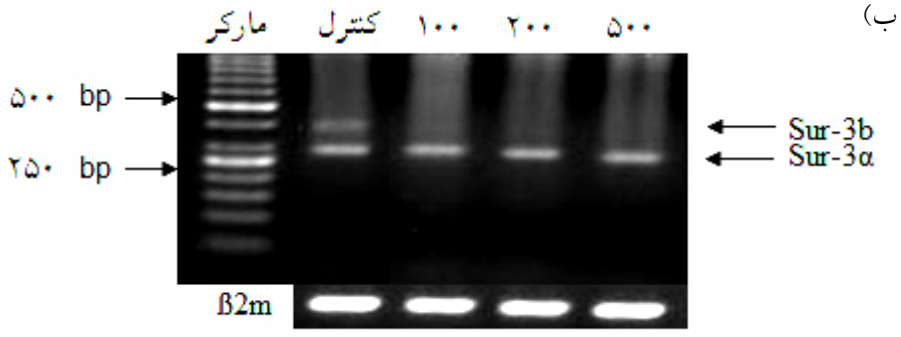
شکل ۱: اثرات ATP بر روی رشد و زیستایی سلول‌های K562. سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی از ATP با فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد تیمار قرار گرفتند و مهار رشد (الف) و زیستایی (ب) سلول‌ها به ترتیب با استفاده از شمارش سلولی و آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه آزمایش مستقل ± خطای استاندارد (SE) نمایش داده شده است. داده‌های نمایش داده شده در نمودار الف از نظر آماری معنادار (P<۰/۰۵) می‌باشند. در نمودار ب داده‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت معنادار (P<۰/۰۵) می‌باشند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]



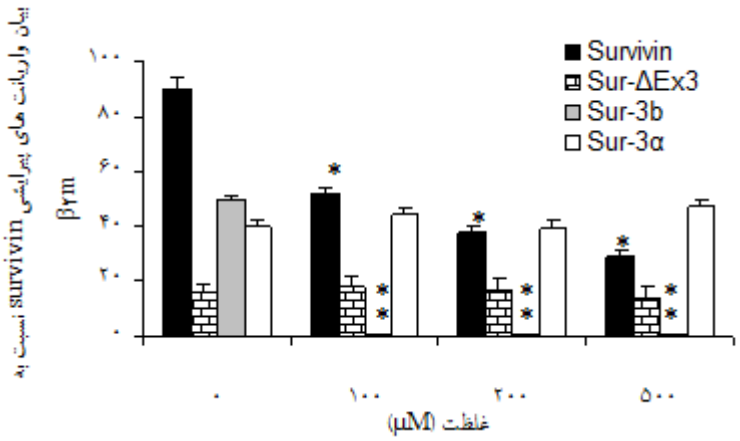
شکل ۲: مطالعه‌ی اثرات آپوپتوزی ATP بر سلول‌های K562. الف: بعد از تیمار سلول‌ها با ATP (غلظت ۵۰۰ میکرومولار) به مدت ۷۲ ساعت خصوصیات ظاهری آپوپتوز با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفته است. وجود سلول‌های سبز و یا نارنجی با هسته‌ی متراکم نشان از وقوع آپوپتوز می‌باشد. ب: DNA ژنومی سلول‌های کنترل و تیمار شده با ATP (۵۰۰ میکرو مولار) به مدت ۷۲ ساعت، استخراج شد و به کمک الکتروفورز میزان قطعه قطعه شدن DNA به عنوان شاخص آپوپتوز بررسی گردید.





شکل ۳: بررسی بیان ژن survivin و واریانت‌های پیرایشی آن با استفاده از تکنیک RT-PCR. الف: سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ATP مورد تیمار قرار گرفت و بیان واریانت های پیرایشی survivin، sur-2b و sur-ΔEx3 با استفاده از RT-PCR نیمه کمی بررسی گردید. از β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. ب: سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ATP مورد تیمار قرار گرفت و بیان واریانت های پیرایشی sur-3b و sur-3α بررسی شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]



شکل ٤: اندازه گیری بیان ژن survivin و واریانت‌های پیرایشی آن با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی. سلول‌های K562 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف ATP مورد تیمار قرار گرفت و بیان واریانت های پیرایشی survivin، sur-ΔEx3، sur-3b و sur-3α با استفاده از نرم افزار uvidoc نسبت به کنترل داخلی β2m اندازه گیری شد. مقادیر نمایش داده شده با (P<0.001*) و (P<0.0001) از نظر آماری معنادار می‌باشند.**

بحث

اگرچه تا کنون روش‌ها و داروهای متعددی برای درمان مبتلایان به سرطان خون به کار گرفته شده است اما با توجه به وجود مقاومت دارویی تلاش‌های گسترده ای در جهت یافتن ترکیبات مؤثرتری که پتانسیل تومور کشی بیشتری داشته باشند و قادر به غلبه بر مقاومت دارویی باشند در جریان است(۱۰). در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شدکه ATP به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب مهار رشد تا ۶۰ درصد در سلول‌های K562 به عنوان مدلی برای فاز بلاست CML می‌شود، به طوریکه غلظت و زمان بهینه‌ی آن ۵۰۰ میکرومولار بعد از ۷۲ ساعت از تیمار می‌باشد. همچنین داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنت و آزمون قطعه قطعه شدن DNA نشان دادکه ATP سبب القای آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود. از آنجایی که اختلال در فرایند آپوپتوز یکی از نقص‌های رایج در سلول‌های سرطانی می‌باشد، القای آپوپتوز می‌تواند به عنوان یکی از استراتژی‌های مورد توجه در درمان سرطان به شمار آید (۶). با توجه به این موضوع اثر آپوپتوزی ATP بر سلول‌های K562 حائز اهمیت است. چنین اثراتی از ATP در مورد سرطان‌های دیگر نیز مشاهده شده است. به عنوان مثال Agteresch و همکارانش نشان داده‌اند که ATP در غلظت‌های ۰/۵ تا ۳ میلی مولار سبب مهار رشدی تا ۶۵ درصد در چهار رده‌ی سلولی سرطان ریه به صورت وابسته به غلظت می‌شود. اگر چه غلظت بهینه‌ی ATP در این مطالعه ۳ میلی مولار و ۶ برابر غلظت بهینه‌ی نتایج ما گزارش شده است ولی آنها مشابه نتایج ما اشاره کرده اند که اثرات ATP در رده های سرطان ریه با مهار رشد، تغییر در شکل ظاهری این سلول‌ها و مرگ سلولی همراه می‌باشد(۱۵). اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ATP بر روی رده‌ی سلولی TE-13 سرطان معده و HT-1376 سرطان مثانه نیز مشاهده شده است به طوریکه ATP در غلظت های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار سبب مهار رشد و القای آپوپتوز می‌گردد(۱۶،۱۷). به علاوه بررسی اثرات ATP بر روی رده‌ی سلولی HL-60 که مدلی برای لوسمی میلوئید حاد محسوب می‌شود نیز یک بازه غلظتی مشابه نتایج ما را نشان داده است به طوری که ATP سبب سرکوب رشد این رده‌ی سلولی در غلظت ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار می‌شود. نکته‌ی جالب توجه در این مطالعه آنست که بر خلاف نتایج مطالعات ما ATP علاوه بر اثرات مهار رشدی قادر به القاء تمایز در رده‌ی سلولی HL-60 نیز می‌باشد(۱۸). در واقع در نتایج مطالعات ما هیچگونه شاخصی مبنی بر القای تمایز در مطالعات ما بر سلولهای K562 مشاهده نگردید و به نظر می‌رسد اثرات ATP در این سلولهای لوسمیک فقط از طریق مهار رشد و به دنبال آن مرگ سلولی می باشد. علاوه بر مطالعات صورت گرفته در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

سرطان‌های مختلف اخیراً اثرات مهار رشدی و آپوپتوزی ATP در سلول‌های طبیعی بنیادی خونی موش نیز گزارش گردیده که بازه‌ی غلظتی اثر آن در غلظت‌های ۰/۱ تا ۱۰ میلی مولار می باشد(۱۹). اما بالاترین اختلاف در زمینه‌ی غلظت بهینه اثرات ATP در مطالعات ما با رده‌ی سلولی Li-7A سرطان کبد می‌باشد که در آن در غلظت‌های غلظت بهینه ۵ میلی مولار برای اثرات ATP گزارش شده است که در ۱۰ برابر بیشتر از مطالعات ما بر سلولهای K562 می‌باشد(۲۰). به طور کلی ازمقایسه نتایج مطالعات دیگران با نتایج این مقاله مشخص می گردد که غلظت‌های مورد استفاده و غلظت بهینه‌ی هر مطالعه با دیگری و با مطالعه‌ی حاضر متفاوت است که این تفاوتها تا حدی می‌تواند مربوط به اختلاف بین رده‌های سلولی وحساسیت متفاوت آنها به دارو باشد. با این حال مهار رشد سلولی و القای مرگ سلولی نقاط مشترک این مطالعات با نتایج ارایه شده در این مطالعه است.

در بررسی مکانیسم اثرات ATP، ما برای اولین باردر مطالعه حاضر نشان دادیم که ATP سبب کاهش بیان ژن Survivin و واریانت پیرایشی ضد آپوپتوزی sur-3b می‌شود. Survivin و واریانت‌های ضد آپوپتوزی آن از جمله قوی ترین مهار کنندگان آپوپتوز به شمار می‌آیند و بیان بالای این ژن در سرطان‌های مختلف با کاهش طول عمر بیماران و مقاومت به درمان همراه است(۶). بنابراین به نظر میرسد کاهش بیان این ژن در ارتباط با مکانیسم اثرات آپوپتوزی ATP باشد. از طرف دیگر با توجه به نقش Survivin در مقاومت به آپوپتوز، کاهش بیان این ژن با استفاده از RNAهای کوچک مداخله گر (siRNA) به عنوان راهبردی نوین در کاهش مقاومت به آپوپتوز و درمان سرطان‌های مختلف مطرح است(۱۰). در این راستا اخیرا Yanq و همکارانش با مطالعه‌ی اثرات الیگونوکلئوتید آنتی‌سنس Survivin بر مقاومت دارویی سلول‌های K562، گزارش کرده‌اند که الیگونوکلئوتید آنتی‌سنس با کاهش بیان این ژن می‌تواند مقاومت دارویی را از طریق کاهش بیان ژن Survivin و القای آپوپتوز از بین ببرد(۲۱). در بررسی صورت گرفته توسط Xiaofei و همکارانش مشاهده شده است که آرسنیک تری اکسید که به طور معمول سبب القای آپوپتوز در غلظت‌های بالا می‌شود در سلول‌های K562 نه تنها باعث القای آپوپتوز نمی‌شود بلکه با افزایش بیان Survivin در سلول‌های K562 همراه می گردد. بنابراین این اثررا به عنوان عامل اصلی مقاومت به آپوپتوز سلول‌های K562 در مقابل آرسنیک تری اکسید مطرح کرده‌اند(۲۲). با توجه به اینکه که در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شده که ATP قادر به کاهش بیان این ژن می‌باشد، لذا اهمیت این دارو از جنبه مقاومت دارویی نیز می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در واقع نکته‌ی جالب در مورد ATP این است که این دارو علاوه بر القای آپوپتوز از طریق کاهش بیان ژن‌های مقاومت به آپوپتوز از قبیل Survivin و واریانت پیرایشی ضد آپوپتوزی Sur-3b می‌تواند به عنوان دارویی با اثرات مفید دوگانه مطرح گردد که از یک طرف سبب مرگ و از طرف دیگر باعث جلوگیری از بروز مقاومت دارویی می‌شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی با توجه به فقدان اثرات جانبی خاص توسط ATP که در مطالعات انسانی صورت گرفته و همچنین رفتار مؤثر آن در القای آپوپتوز همگام با کاهش بیان IAP ها می‌توان این ترکیب را به عنوان داروی قوی و مؤثر در درمان CML معرفی نمود.

سپاسگزاری

حمایت مالی این کار از محل طرح پژوهشی و پژوهانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز صورت گرفته و بدین وسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر رستمی، دکتر حقیقت و دیگر همکاران تشکر می‌نمایند.

منابع:

1- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. ***The molecular biology of chronic myeloid leukemia***. Blood. 2000; 96(10): 3343-56.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

2- O'Dwyer M. ***Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias.*** The Oncologist. 2002; 7(1): 34-8.

3- Quintas-Cardama A, Cortes JE. ***Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment.*** Mayo Clin Proc. 2006; 81(7): 973-88.

4- Drummond MW, Holyoake TL. ***Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukaemia: so far so good.*** Blood Rev. 2001; 15(2): 85-95.

5- Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. ***Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies.*** Leukemia. 2003; 17(7): 1211–62.

6- Li F. ***Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis***. Br J Cancer 2005; 92(2): 212-6.

7- Altieri DC. ***Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer.*** Prog Cell Cycle Res. 2003; 5(1): 447-52.

8- Quhitit A, Matrouguni K, Bengrine A, Koochekpour S, Zerfqou M, Yousief Z. ***Survivin is not only a death encounter but also a survival protein for invading tumor cells***. Front Biosci. 2007;12(1): 1260-70.

9- Contea E, Stagnob F, Guglielmob P, Scutoa A, Consoli C, M Angelo. ***Survivin expression in chronic myeloid leukemia.*** Cancer Letters. 2005; 225(1):105–10.

10- Schimmer AD. ***Apoptosis in leukemia: From molecular pathways to targeted therapies.*** Best Pract Res Clin Haematol. 2008; 21(1): 5–11.

11- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. ***P2 receptors: intracellular signaling***. Pflugers Arch. 2006; 452(5): 552–62.

12- White N, Burnstock G. ***P2 receptors and cancer.*** Trends Pharmacol Sci. 2006; 27(4): 211-7.

13- Rapaport E. ***Treatment of Human Tumor Cells With ADP or ATP Yields Arrest of Growth in the S Phase of the Cell Cycle.*** J Cell Physiol 1983; 114(3): 279-83.

14- Lozzio BB, Lozzio CB. ***Properties of the K562 cell line derived from a patient with choronic myeloid leukemia.*** Int J Cancer. 1977; 19(1): 136-7.

15- Agteresch HJ, Rooijen MH, Berg JW, Minderman-Voortman GJ, Wilson JHP, Dagnelie PC. ***Growth inhibition of lung cancer cells by adenosine 5́-triphosphate.*** Drug Develop Res. 2003; 60(3):196–203.

16- Wang MX, Ren LM, Shan BE. ***Inhibitory effects of extracellular adenosine triphosphate on growth of esophageal carcinoma cells.*** World J Gastroenterol. 2005; 11(38):5915-9.

17- Shabbir M, Ryten M, Thompson C, Mikhailidis D, Burnstock G. ***Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer***. BJU International. 2007, 101(1): 106–12.

18- Yoon MJ, Lee HJ, Kim JH, Kim DK. ***Extracellular atp induces apoptotic signaling in human monocyte leukemic cells, HL-60 and F-36P.*** Arch Pharm Res. 2006; 29(11): 1032-41.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]

19- Yoon MJ, Lee HJ, Lee YS, Kim JH, Park JK, Chang WK, et al. ***Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells.*** Biol Pharm Bull. 2007; 30(4): 671-6.

20- Wen LT, Knowles AF. ***Extracellular ATP and adenosine induce cell apoptosis of human hepatoma Li-7A cells via the A3 adenosine receptor.*** Br J Pharmacol. 2003; 140(6): 1009-18.

21- Yang S, Xu YH, Wen XH, Chen L, Li X. ***Effects of survivin antisense oligodeoxynucleotide on drug resistance in K562 cells.*** Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2008: 39(6):905-8.

22- Wu X, Chen Z, Liu Z, Zhou H, You Y, Li W, et al. ***Arsenic trioxide inhibits proliferation in K562 cells by changing cell cycle and survivin expression.*** J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2004; 24(4): 342-4.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-11-26]