

ارزیابی بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در آستروسیت‌های جداسده از بافت مغز انسان تحت اثر اگزوژوم‌های سرطان خون

پریسا زمانی عصمتی^۱، جواد بهارآرا^{۲*}، سجاد سحاب نگاه^۳، خدیجه نژاد شاهرخ‌آبادی^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: تهاجم سرطان‌ها از جمله لوسومی به سیستم عصبی مرکزی اتفاق می‌افتد، سلول‌های سرطانی ویژگی تکثیر و مقاومت در برابر آپوپتوز دارند. از طرفی اگزوژوم‌ها با ایجاد ارتباطات سلول به سلول موجب پیشرفت سرطان‌ها می‌شوند، در این مطالعه اثر اگزوژوم‌های سرطان خون بر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در آستروسیت‌ها بررسی گردید.

مواد و روش کار: پس از کشت اولیه سلول‌های عصبی استخراج شده از بافت مغز، و ارزیابی ایمونوستیتوشیمی توسط آنتی‌بادی‌های SOX2، Nestin، GFAP، از روش تیپسیناژ جهت جداسازی آستروسیت‌ها استفاده گردید. اگزوژوم‌ها از محیط کشت رده‌ی Nalm6 به روش اولتراسانتریفیوژ استخراج گردید و اثرات آن‌ها بر تکثیر و بیان ژن‌های Bax و Bcl2 به ترتیب توسط آزمون DAPI و Real time PCR در آستروسیت‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج ایمونوستیتوشیمی خلوص بالای ۹۰ درصد آستروسیت‌ها را نشان داد. آزمون DAPI پس از گذشت ۴۸ ساعت نشان‌دهنده‌ی افزایش معنادار آستروسیت‌ها تحت تیمار با اگزوژوم (۵۰ µg/ml) نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.01$). همچنین میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در آستروسیت‌های تحت تیمار با اگزوژوم به ترتیب نشان‌دهنده‌ی کاهش و افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل بوده است ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: اگزوژوم‌های سرطان خون موجب بر هم زدن تعادل در تکثیر آستروسیت‌ها و مهار آپوپتوز در آن‌ها با تغییر در بیان ژن‌های Bax و Bcl2 می‌گردد، بنابراین مطالعات بیشتر جهت شناسایی مسیرهای دقیق مولکولی دخیل در سرطان پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آستروسیت‌ها، سرطان، اگزوژوم، GFAP، آپوپتوز

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره دوازدهم، ص ۹۱۲-۹۲۰، اسفند ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: مشهد، مرکز تحقیقات تکوین جانوری بیولوژی کاربردی تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۳۷۰۹۲

Email: baharara78@gmail.com

مقدمه

استراتژی‌های درمانی در دسترس محدود و با عوارض جانبی بالا(۳)، نشان‌دهنده‌ی اهمیت تشخیص به موقع در این بیماران و لزوم درمان‌های هدفمندتر می‌باشد، در این راستا شناسایی سلول‌های اصلی و عوامل دخیل در این فرایند می‌تواند مهم و راه گشا باشد. آستروسیت‌ها اولین و بیشترین سلول‌ها در سد خونی مغزی‌اند (۴) و بهطور مستقیم در توسعه متابستازه‌ای مغز دخالت دارند(۵). آستروسیت‌ها در گذشته به عنوان یک عامل غیرفعال در مغز معرفی می‌شوند، اما امروزه به عنوان تنظیم‌کننده‌های فعال در عملکرد سیناپس‌ها و تشكیل سد خونی مغزی یاد می‌شوند(۶). بنابراین

سرطان دومین علت مرگ‌ومیر در جهان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی به شمار می‌آید و متأسفانه شیوع کلی تومورهای بدخیم شایع از ۱۴ میلیون نفر در سال ۲۰۱۲ به ۱۹ میلیون نفر در سال ۲۰۲۵ پیش‌بینی شده است(۱). سرطان خون رتبه پنجم کشنده‌ی در جهان و دوم در ایران را به خود اختصاص داده است، ازین‌رو بررسی عوامل مؤثر بر بقای این دسته از بیماران بسیار حائز اهمیت است، در این‌بین شواهد و مطالعات متعددی حاکی از تهاجم سرطان‌های خون به سیستم عصبی مرکزی بوده است(۲).

^۱ گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات تکوین جانوری بیولوژی کاربردی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نويستنده مسئول)

^۳ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۴ گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

شناسایی سلول‌های بافت مغز به روش ایمونوپرتوشیمی: جهت شناسایی اولیه پیش‌سازهای عصبی و آستروسیت‌ها استخراج شده از بافت مغز، به ترتیب از آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده نمودیم. به طوری که 2×10^3 GFAP و SOX2، Nestin سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند، ۲۴ ساعت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پارفارمالدیهید ۴ درصد قرار گرفتند. پس از آن از Triton X-100 (غلظت ۵٪) و بلاکر جهت نفوذ‌پذیری سلول‌ها استفاده شد. در مرحله بعد، سلول‌ها در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه اختصاصی (۱:۱۰۰۰) قرار گرفتند و به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و آنتی‌بادی کونژوگه قاتویه FITC (۱:۱۰۰۰) به مدت یک ساعت در محیط تاریک اضافه شد. سرانجام، پس از شستشو با PBS، از PI برای شناسایی سلول‌ها استفاده شد. برای مشاهده و عکسبرداری از میکروسکوپ فلورسانس Olympus Image J استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویری و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (شکل ۱).

جداسازی اگزوژوم‌ها از محیط کشت سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک به روش اولتراسانتریفیوژ: رده‌ی Nalm6 (تهیه شده از استیتو پاستو، ایران) در محیط کشت کامل RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲ درصد آنتی بیوتیک کشت داده شد و در انکوباتور تحت شرایط CO₂ ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هنگامیکه تراکم سلولی در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، محیط کشت قبلی خارج و محیط کشت جدید به آن اضافه گردید، پس از ۴۸-۲۴ ساعت می‌تواند آن‌ها جمع آوری شد و به ترتیب g ۳۰۰ و ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید، پس از آن اولتراسانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و در نهایت پلت اگزوژومی حاصل در ۲۰۰ ml PBS حل گردید. و غلظت پروتئین محلول اگزوژومی توسط کیت BCA (Kiazist Life Sciences, Iran) به دست آمد (۱۴).

ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها توسط رنگ آمیزی DAPI: تعداد مساوی 5×10^5 سلول در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه آستروسیت‌ها یک گروه تحت تیمار با اگزوژوم ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) و گروه کنترل هیچ‌گونه تیماری دریافت نکرد. ۴۸ ساعت بعد محیط کشت موجود در هر خانه به آرامی تخلیه گردید و ۲ بار هر کدام به مدت ۵ دقیقه با ۳۷ PBS درجه سانتی گراد شستشو شد. در مرحله بعدی PBS تخلیه شد و سلول‌ها در معرض محلول رقیق شده DAPI با اتانول ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) (۳۰۰ میکرولیتر برای هر خانه) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق

عملکرد آستروسیت‌ها در بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مورد توجه محققان می‌باشد (۷). از این‌رو با توجه به محدودیت دسترسی به سلول‌های CNS، استخراج و شناسایی این سلول‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

از طرفی امروزه نقش اگزوژوم‌ها در موقع متابستاز در سرطان‌های مختلف به اثبات رسیده است. این میکرووزیکول‌های مشتق از غشاء انواع سلول‌ها به عنوان عوامل جدید ارتقاء رشد تومور و متابستاز سلول‌های سرطانی شناخته شده‌اند (۸). بر اساس نتایج اخیر محققان اگزوژوم‌های مشتق از لوسمی در میکرومیک مغز استخوان موجب تقویت تکثیر و بقای سلول‌های لوسمیک شده و خون‌سازی طبیعی را مهار می‌کنند (۹). در سرطان مسیرهای سیگنالینگ غیرقابل‌کنترل می‌شوند و این تنظیم غیرعادی نقش اساسی در سرطان دارد و منجر به تکثیر بیش از حد سلول، مقاومت در برابر آپوپتوز و درنتیجه پیشرفت سرطان می‌شود. بنابراین فعل شدن عوامل انکوژن با مهار آپوپتوز رخ می‌دهد (۱۰). بررسی ژن‌های دخیل در سرطان در مطالعات اخیر می‌تواند چشم‌انداز امیدوارانه‌ای در شناخت و درمان سرطان ترسیم کند (۱۱). بر اساس نتایج محققین اگزوژوم‌های مشتق از رده‌ی سرطان مثانه با مهار آپوپتوز از طریق افزایش بیان پروتئین مقاومت به آپوپتوز Bcl2 و کاهش پروتئین آپوپتوزی Bax موجب پیشرفت این سرطان شده‌اند (۱۲). در مطالعه حاضر اثر اگزوژوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان خون لنفوبلاستیک بر تکثیر و تغییر بیان ژن‌های Bcl2 و Bax در آستروسیت‌ها با رویکرد بررسی مسیر ضدآپوپتوزی منجر به متابستاز بررسی گردید.

مواد و روش کار

جداسازی آستروسیت‌ها از سایر سلول‌های بافت مغز: در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی برای استخراج آستروسیت‌ها از قسمتی از یک نمونه بافت مغز جنین انسان با همکاری بیمارستان ام البنین مشهد و اخذ کد اخلاقی IR.IAU.MSHD.REC.1397.092 کردن بافت مغز در PBS و سانتریفیوژ، جهت هضم آنزیمی تریپسین اضافه گردید. به منظور شمارش سلول $2/5 \text{ ml}$ محیط کشت به بافت حاوی سلول افزوده گردید، سپس 10 میکرولیتر تریپان به لو با 10 میکرولیتر از سلول‌ها جهت شمارش به لام نئوبار منتقل شد و پس از کشت سلول‌ها هر ۳ روز توسط محیط کشت کامل DMEMF12 (Bio-Idia.Iran) تغذیه شد. سپس توالی از تریپسینه کردن سلول‌ها موجب مرگ سایر سلول‌ها گردید در حالی که آستروسیت‌ها به طور محکم به سطح فلاسک متصل بودند و درنتیجه خاص‌سازی آستروسیت‌ها انجام گردید. (۱۳).

Elmer Applied Biosystems, Boston, MA استفاده گردید. همچنین یک جفت پرایمر برای هر یک از ژن‌های مورد مطالعه و ژن کنترل داخلی (beta Actin)، طراحی شده و اتصال اختصاصی آن‌ها در سایت NCBI چک گردید، که اطلاعات آن‌ها در جدول شماره ۱ آمده است. در نهایت Real-time PCR با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین (Ampliqon) و پرایمرهای اختصاصی توسط دستگاه Bio Rad (US)Bio Rad انجام شد میزان بیان در هر نمونه برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از مقدارهای CT محاسبه شد. بیان ژن نسبت به بیان ژن beta Actin نرمالیزه شد. مقادیر نرمالیزه توسط نمونه‌های کنترل هر گروه استاندارد سازی شد. مقدار تغییر یافته بیان ژن‌ها در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه کنترل که به وسیلهٔ میزان بیان ژن beta Actin نرمالیزه شده است، و از روش $\Delta\Delta CT$ برای تعیین تغییرات نسبی بیان ژن بین نمونه‌ها استفاده شد و مقادیر نهایی با محاسبه fold change به دست آمد(۱۶). فرمول‌های محاسبات به شرح ذیل آمده است:

$$\Delta CT = CT_{target} - CT_{reference}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{test\ sample} - \Delta CT_{control\ sample}$$

$$\text{Relative expression: } 2^{-\Delta\Delta CT}$$

قرار گرفتند. انکوبه کردیم، سپس ۲ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد، با متانول فیکس، و توسط میکروسکوپ فلئورسنت عکسبرداری شد. در نهایت تعداد سلول‌ها، توسط نرم‌افزار Image J شمارش و نمودار آن در Excel ۲۰۱۶ رسم گردید(۱۵).

آنالیز Real-time PCR

تعداد مساوی 1×10^6 آستروروسیت در پلیت ۶ خانه برای ۲۴ ساعت کشت داده شد، سپس یک گروه تحت تیمار با اگزوزوم ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) و گروه کنترل هیچ‌گونه تیماری دریافت نکرد (۳ بار تکرار برای هر گروه در نظر گرفته شد). ۷۲ ساعت بعد از تیمارجهت استخراج RNA سلول‌ها توسط تراپیول (Parstoo, Iran) لیز شدندو لیزات سلولی پس از انتقال به میکروتیوب‌های Epoch, BioTek, Winooski, VT, United States گردید و تعیین غلظت کمی RNA به روش نانودرایپ توسط DEPC water حل ایزوپروپانول رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر Epoch, BioTek, Winooski, VT, United States استخراج شده توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس به cDNA تبدیل می‌شود، در این مرحله جهت سنتز cDNA بر اساس پروتکل از کیت سنتز Perkin و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Parstoo, Iran)

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Real Time – PCR

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
beta Actin	5'CTTCCTCCTGGCATG3'	5'GTCTTGCGGATGTCCAC3'
Bax	5'TTTGCTTCAGGGTTCAAGTCGT3'	5'CTCCATGTTACTGTCCAGTCGT3'
BCL2	5'TCACGTACACTGCCCTGAAG3'	5' CAGATAGGCACCCAGGGTGAT3'

ارزیابی سلول‌های بافت مغز توسط آزمون

ایمونوستیتوشیمی و شناسایی آستروروسیت‌ها:

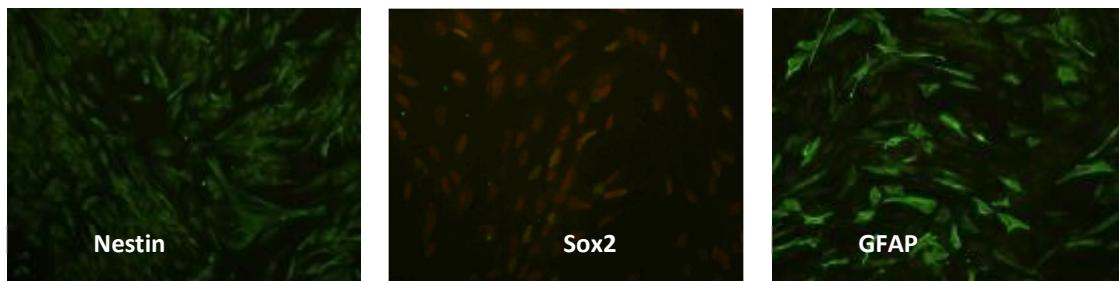
سلول‌های اولیه استخراج شده از بافت مغز توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی Nestin، GFAP و Sox2 به روش ایمونوستیتوشیمی شناسایی و با میکروسکوپ فلئورسنت عکسبرداری گردید (شکل ۱). چند هفته پس از کشت اولیه، آزمون ایمونوستیتوشیمی توسط

آنالیز آماری:

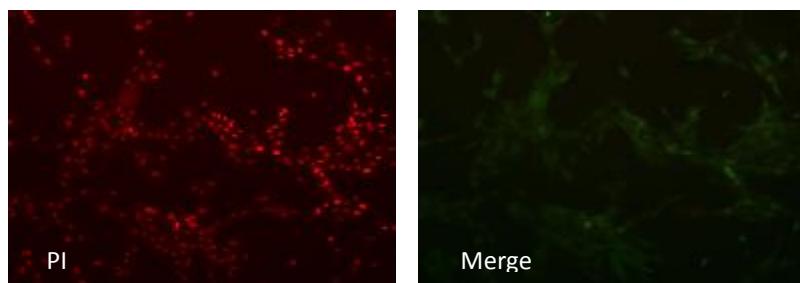
بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معناداری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

آنتی‌بادی اختصاصی GFAP جهت تأیید خلوص آستروسیت‌ها انجام گردید (شکل ۲).



شکل (۱): ارزیابی اولیه ایمونوستیتوشیمی سلول‌های استخراج شده از بافت مغز توسط آنتی‌بادی‌های Nestin و Sox2 و GFAP و عکسبرداری با میکروسکوپ فلورئسنت ($\times 100$).

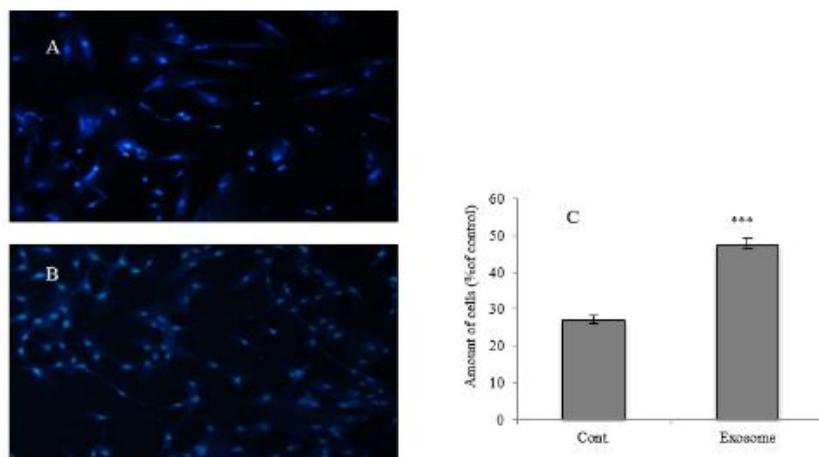


شکل (۲): ایمونوستیتوشیمی ($\times 100$). تصویر نشان‌دهنده سلول‌های GFAP مثبت است، به ترتیب از چپ به راست هسته رنگ امیزی شده سلول‌ها با PI (قرمز) و سیتوپلاسم رنگ امیزی شده با GFAP (سبز رنگ) توسط میکروسکوپ فلورئسنت.

۴۸ ساعت پس از تیمار این سلول‌ها توسط اگزوژوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان خون ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) نشان‌دهنده افزایش معنادار تعداد آستروسیت‌ها نسبت به گروه کنترل (تیمار با PBS) می‌باشد (شکل ۱۱).
 $P < 0.001$.

ارزیابی تکثیر آستروسیت‌ها به روش DAPI

اگزوژوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان خون موجب تکثیر آستروسیت‌ها می‌شوند. بر اساس تصاویر به دست آمده از آزمون DAPI و بررسی هسته سلول‌های آستروسیت توسط رنگ DAPI

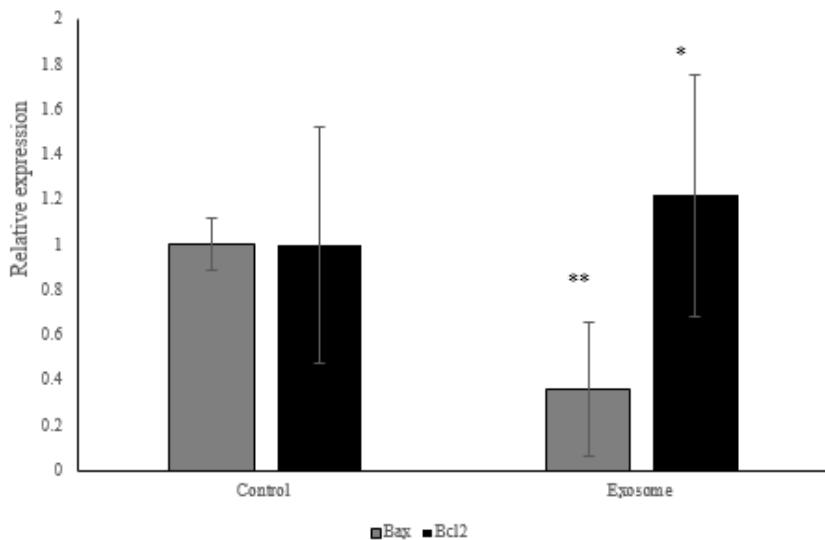


شکل (۳): سمت چپ تصویر فلورئسنت از رنگ امیزی هسته DAPI نشان‌دهنده اثر اگزوژوم‌های سرطانی بر تعداد آستروسیت‌ها می‌باشد، گروه کنترل و B گروه تیمار با اگزوژوم ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) ($\times 100$). نمودار سمت راست نشان‌دهنده افزایش معنادار در تعداد آستروسیت‌ها نسبت به گروه کنترل تحت اثر اگزوژوم‌ها بوده است ($P < 0.001$).

سرطانی ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) نسبت به گروه کنترل می‌باشد. همچنین بیان ژن Bcl2 به عنوان یک ژن ضدآپوپتوزی نیز دارای افزایش معنادار ($P<0.05$) در گروه آستروسیت‌های تیمار شده با اگزوژوم‌های سرطانی ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) نسبت به گروه کنترل می‌باشد (شکل ۴).

ارزیابی بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در آستروسیت‌ها تحت اثر اگزوژوم‌های سرطانی به روش Real time PCR

بر اساس یافته‌های Real-time PCR حاصل از این پژوهش بیان ژن Bax به عنوان یک ژن آپوپتوزی دارای کاهش معنادار ($P<0.01$) در گروه آستروسیت‌های تیمار شده با اگزوژوم‌های



شکل (۴): آنالیز بیان ژن توسط Real time PCR. آستروسیت‌های تیمار شده با اگزوژوم‌های سرطان خون ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) در مقایسه با گروه کنترل، بیان ژن‌های Bax و Bcl2 به ترتیب دارای کاهش و افزایش معنادار ($P<0.01$ و $P<0.05$) در گروه تیمار با اگزوژوم نسبت به گروه کنترل می‌باشند.

در پژوهش حاضر آستروسیت‌ها از سایر سلول‌های عصبی در شرایط آزمایشگاهی جداسازی و کشت داده شدند (۱۳) و از آنتی‌بادی GFAP در آزمون ایمونوپوشیمی جهت شناسایی آستروسیت‌های استخراج شده از بافت مغز استفاده نمودیم (۲۳ و ۲۴).

اگزوژوم‌ها به عنوان ابزارهای مهم ارتباطات سلول-سلول در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک عمل می‌نمایند (۷) و منجر به تغییر در رفتار سلول میزان می‌شوند (۲۵). به طوری که بر اساس مطالعات اخیر، اگزوژوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان سینه با ایجاد تغییرات در آستروسیت‌های سد خونی مغزی، به واسطه‌ی حضور برخی پروتئین‌ها در اگزوژوم و گیرنده‌ی آن‌ها در آستروسیت‌ها موجب تسهیل متاستاز در مغز شده است (۲۶).

اگزوژوم‌های مشتق از تومور می‌توانند تکثیر سلول‌های سرطانی را تحریک کنند، به طوری که اگزوژوم‌های مشتق از گلیوبلاستوما موجب القا تکثیر سلولی در رده‌ی گلیوما U87 انسانی شده است

بحث و نتیجه‌گیری

تقریباً ۸۰٪ درصد از کل سرطان‌های داخل جمجمه ناشی از متاستاز‌های مغزی است (۱۷). در این فرآیند میکرومحیط سایت‌های متاستاتیک، نقش مهمی را برای حمله سلول‌های تومور در بافت‌های هدف ایفا می‌کند (۱۸). از طرفی تعاملات آستروسیت‌ها در CNS با سلول‌های سرطانی و مسیرهای سیگنالینگ آن‌ها می‌تواند در القای متاستاز نقش مهمی داشته باشد (۱۹). آستروسیت‌ها می‌توانند یک تیغه‌ی دو لبه دارای اثرات مهارکننده و تحریک کننده در سرطان‌های سیستم عصبی مرکزی باشند (۲۰). همچنان که در مطالعات قبلی در بررسی متاستاز سرطان‌های ملانوما و ریه به سیستم عصبی مرکزی، آستروسیت‌ها را مورد مطالعه قرار دادند (۲۱). با توجه به اهمیت آستروسیت‌ها در تغییرات پاتوفیزیولوژیک سیستم عصبی مرکزی، امروزه توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است (۲۲).

Bcl2 دارای افزایش معنادار نسبت به نمونه کنترل می‌باشد ($P < 0.05$ و $P < 0.01$). از آنجاکه تحقیقات کمی بر روی اثرات احتمالی اگزوژومهای سرطان خون در آستروسیت‌ها صورت گرفته است، در آینده نزدیک با بررسی‌های دقیق مسیرهای مولکولی منجر به متأسیتاز از طریق اگزوژومهای سرطانی می‌توان از آن‌ها به عنوان ابزارهای تشخیصی و یا حتی درمانی هدفمند در سطح بالینی استفاده نمود. در این پژوهش تجربی آزمایشگاهی محدودیت‌های اخلاقی در استفاده از منابع سلولی انسانی و همچنین هزینه‌های استخراج اگزوژومها ای سرطانی موجب محدودیت در انجام سایر بررسی‌های آزمایشگاهی و همچنین تکرارپذیری آزمون‌های انجام شده گردید.

بر اساس نتایج این پژوهش اگزوژومهای سرطان خون از مسیر ضد آپوپتوز در این سلول‌ها با تغییر در بیان ژن‌های Bax و Bcl2 موجب افزایش تکثیر و بقا گردیده است. بنابراین بررسی سایر مسیرهای منجر به سرطان و بررسی سایر ژن‌های دخیل در سیگنالینگ سرطان و همچنین اثرات بعدی اگزوژومهای سرطانی از طریق ارتباط آستروسیت‌ها با سایر سلول‌های عصبی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر فاطمه تارا ریاست وقت بیمارستان ام البنین مشهد که ما را در این پژوهه یاری نمودند قدردانی می‌گردد. نتایج این پژوهش بخشی از رساله دکтри تخصصی می‌باشد که در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام گردیده است.

(۲۷). نتایج آزمون DAPI در مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده‌ی افزایش معنادار تعداد آستروسیت‌های تحت تیمار با اگزوژومهای سرطانی نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.001$). بنابراین با توجه به حضور بیشمار آستروسیت‌ها در CNS و از آنجاکه تکثیر سلولی یکی از نشانه‌های سرطان است، احتمالاً اگزوژومهای سرطانی نقش موثری در پیشرفت سرطان دارند.

اگزوژومهای مشتق از سرطان خون لنفوبلاستیک با فعال شدن مسیر ضد آپوپتوزی موجب تکثیر و بقا در این سلول‌های توموری می‌گرددند (۲۸). همچنین بر اساس نتایج مطالعه‌ی دیگری در شرایط invivo، پس از تیمار موش‌ها با اگزوژومهای مشتق از ملانوما، سرعت رشد و مهار آپوپتوز در سلول‌های تومور ملانوما افزایش یافته است (۲۹). تاکنون مطالعات فراوانی بر روی انواعی از ژن‌های مرتبط با سرطان انجام شده است، سلول‌های تومور و سلول‌های ایمنی بدن از طریق افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزی Bcl2 و کاهاش پروتئین‌های آپوپتوزی از جمله Bax موجب بقای سلول‌های سرطانی می‌شوند (۳۰). بر هم خوردن تعادل بین ژن‌های ضد آپوپتوز و پیش‌برنده‌ی آپوپتوز یکی از دلایل شروع و گسترش سرطان است، که در این بین Bcl2 به عنوان مهار کننده‌ی آپوپتوز با برهمکش با ژن‌های پیش‌برنده‌ی آپوپتوز نظیر Bax موجب مهار آپوپتوز می‌شود که در سرطان‌های مختلف گزارش شده است (۳۱). در پژوهش حاضر بیان ژن‌های Bax و Bcl2 به عنوان تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز و مرگ سلولی در مسیر سیگنالینگ آپوپتوز، در آستروسیت‌های تحت تیمار با اگزوژومهای سرطانی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی تفاوت در میزان بیان این دو ژن نسبت به نمونه کنترل بود، به طوری که در آستروسیت‌های تحت تیمار با اگزوژومهای سرطانی میزان بیان ژن Bax دارای کاهش معنادار و میزان بیان ژن

References:

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 2011;144(5):646-74.
2. Moore CA, Ibrahim M, Kapila A, Bajaj K. Glioblastoma Multiforme in a Patient with Multiple Myeloma: A Case Report and Literature Review. *Perm J* 2018;22:17-125
3. Berghoff AS, Preusser M. The inflammatory microenvironment in brain metastases: potential treatment target? *Chin Clin Oncol* 2015;4(2):21.
4. Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem* 2007;101(2):555-65.
5. Kondegowda NG, Fenutria R, Pollack IR, Orthofer M, Garcia-Ocaña A, Penninger JM, et al. Osteoprotegerin and denosumab stimulate human beta cell proliferation through inhibition of the receptor activator of NF-κB ligand pathway. *Cell Metab* 2015;22(1):77-85.
6. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front Immunol* 2016;7:160.
7. Gutzeit C, Nagy N, Gentile M, Lyberg K, Gumz J, Vallhov H, et al. Exosomes derived from Burkitt's

- lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J Immunol* 2014;192(12):5852-62.
8. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883-91.
 9. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami J, Hu X, et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia* 2018;32(3): 575-87.
 10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell* 2000;100(1):57-70.
 11. Reza Noori Daloii M, Fazilaty Mina Tabrizi H. Cancer metastasis, genetic and microenvironmental factors of distant tissue: a review article. *Tehran Univ Med J* 2013;70(11) :671-83. [Persian]
 12. Yang L, Wu X-H, Wang D, Luo Ch-Li, Chen L-X. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Mol Med Rep* 2013;8(4):1272-8.
 13. Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J-i, Kim SU. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PloS one* 2014;9(4):e92325.
 14. Sokolova V, Ludwig A-K, Hornung S, Rotan O, Horn P A, Epple M, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;87(1): 146-50.
 15. Othman N, Jamal R, Abu N. Cancer-Derived Exosomes as Effectors of Key Inflammation-Related Players. *Front immunol* 2019;10:2103.
 16. Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 2001; 25(4):402-8.
 17. Sprowls SA, Arsiwala TA, Bumgarner JR, Shah N, Lateef SS, Kielkowski BN, et al. Improving CNS Delivery to Brain Metastases by Blood-Tumor Barrier Disruption. *Trends cancer* 2019;5(8):495-505.
 18. Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells* 2019;8(7):727.
 19. Izraeli S, Eckert C. Targeted therapy of CNS leukemia? *Blood* 2017;130(5):562-3.
 20. Hosonaga M, Saya H, Arima Y. Molecular and cellular mechanisms underlying brain metastasis of breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2020;39(3):711-20.
 21. Langley RR, Fan D, Guo L, Zhang C, Lin Q, Brantley EC, et al. Generation of an immortalized astrocyte cell line from H-2Kb-tsA58 mice to study the role of astrocytes in brain metastasis. *Int J Oncol* 2009;35(4):665-72.
 22. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glycan-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015;523(7559):177-82.
 23. Sovrea AS, Boşca AB. Astrocytes reassessment-an evolving concept part one: embryology, biology, morphology and reactivity. *J Mol Psychiatry* 2013;1(1):18.
 24. Middeldorp J, Hol E. GFAP in health and disease. Progress in neurobiology. *Prog Neurobiol* 2011;93(3):421-43.
 25. Sharifi H, Shafiee A, Molavi G, Razi E, Mousavi N, Sarvizadeh M, et al. Leukemia - derived exosomes: Bringing oncogenic signals to blood cells. *J cell biochem* 2019;120(10):16307-15.
 26. Morad G, Otu H H, Dillon S T, Moses M A. Using proteomics profiling to elucidate the interactions of breast cancer-derived exosomes with the blood-brain barrier. *ACS Nano*. 2019;13(12): 13853–13865.
 27. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma

- microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6.
28. Raimondo S, Saieva L, Corrado C, Fontan, S, Flugy A, Rizzo A, et al. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes promote tumor growth through an autocrine mechanism. *Cell Commun Signal* 2015;13(1): 1-12.
29. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, et al. Accelerated growth of B16 BL 6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16 BL 6 cells. *Cancer sci* 2017; 108(9):1803-10.
30. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol* 2011;3(4):279-96.
31. Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ* 2018;25(1):27-36.

INVESTIGATION OF BAX AND BCL2 GENE EXPRESSION IN ASTROCYTES ISOLATED FROM HUMAN BRAIN TISSUE UNDER THE EFFECTS OF LEUKEMIA EXOSOMES

Parisa Zamani Esmati¹, Javad Baharara^{2}, Sajad Sahab-Negah³, Khadijeh Nejad Shahrokhbadi⁴*

Received: 28 August, 2020; Accepted: 26 December, 2020

Abstract

Background & Aims: Unfortunately, today cancers such as leukemia metastasize to the central nervous system (CNS). Cancer cells proliferate and resist apoptosis features. On the other hand, exosomes promote cancer through cell-to-cell communication. This study investigated the effect of leukemia exosomes on the expression of apoptosis-related genes in astrocytes.

Materials & Methods: After the primary culture of brain tissue cells, Immunocytochemical evaluation of cells was performed by specific antibodies Nestin, SOX2, and GFAP. Then, astrocytes were purified from other cells by trypsinage. Exosomes were extracted from supernatant of Nalm6 cell line by ultracentrifugation and their effects on proliferation and expression of Bax and Bcl2 genes were assessed by DAPI and Real-time PCR in astrocytes, respectively.

Results: Results indicated a purity of over 90% of astrocytes in cell culture medium. DAPI test after 48 hours showed a significant increase in astrocytes treated with exosome (50µg/ml) compared to the control group ($p < 0.01$). Also, the expression of Bax and Bcl2 genes in exosome-treated astrocytes showed a significant decrease and increase compared to the control group ($p < 0.01$ and $p < 0.05$), respectively.

Conclusion: Leukemia exosomes disrupt the balance of astrocyte proliferation and inhibit apoptosis in them by altering the expression of Bax and Bcl2 genes. Therefore, further studies are recommended to identify exact molecular pathways of cancer.

Keywords: Astrocytes, cancer, exosome, GFAP, apoptosis

Address: Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Tel: 051-38437092

Email: baharara78@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(12): 920 ISSN: 2717-008X

¹ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

² Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran Corresponding Author)

³ neuroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran and Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alania Hospital, Tehran, Iran

⁴ Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran