

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

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

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

چکیده

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

مواد و روش کار: پس از کشت اولیه سلول‌های عصبی استخراج‌شده از بافت مغز، و ارزیابی ایمونوسیتوشیمی توسط آنتی‌بادی‌های SOX2، Nestin و GFAP، از روش تریپسیناژ جهت جداسازی آستروسیت‌ها استفاده گردید. آگروزوم‌ها 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 ایمونوسیتوشیمی خلوص بالای ۹۰ درصد آستروسیت‌ها را نشان داد. آزمون DAPI پس از گذشت ۴۸ ساعت نشان‌دهنده‌ی افزایش معنادار آستروسیت‌ها تحت تیمار با آگروزوم (۵۰ μg/ml) نسبت به گروه کنترل می‌باشد (P < ۰/۰۰۱). همچنین میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl2 در آستروسیت‌های تحت تیمار با آگروزوم به ترتیب نشان‌دهنده‌ی کاهش و افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل بوده است (P < ۰/۰۵ و P < ۰/۰۱).

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

کلیدواژه‌ها: آستروسیت‌ها، سرطان، آگروزوم، GFAP، آپوپتوز

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره دوازدهم، ص ۹۲۰-۹۱۲، 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 به‌موقع در این بیماران و لزوم درمان‌های هدفمندتر می‌باشد، در این راستا شناسایی سلول‌های اصلی و عوامل دخیل در این فرایند می‌تواند مهم و راه‌گشا باشد. آستروسیت‌ها اولین و بیشترین سلول‌ها در سد خونی مغزی‌اند (۴) و به‌طور مستقیم در توسعه متاستازهای مغز دخالت دارند (۵). آستروسیت‌ها در گذشته به‌عنوان یک عامل غیرفعال در مغز معرفی می‌شدند، اما امروزه به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های فعال در عملکرد سیناپس‌ها و تشکیل سد خونی مغزی یاد می‌شوند (۶). بنابراین

سرطان دومین علت مرگ‌ومیر در جهان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی به‌شمار 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 کشندگی در جهان و دوم در ایران را به خود اختصاص داده است، از این‌رو بررسی عوامل مؤثر بر بقای این دسته از بیماران بسیار حائز اهمیت است، در این بین شواهد و مطالعات متعددی حاکی از تهاجم سرطان‌های خون به سیستم عصبی مرکزی بوده است (۲).

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

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

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

^۴ گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

شناسایی سلول‌های بافت مغز به روش ایمونوسیتوشیمی:

جهت شناسایی اولیه پیش‌سازهای عصبی و آستروسیت‌ها ی استخراج‌شده از بافت مغز، به ترتیب از آنتی‌بادی‌های اختصاصی Nestin، SOX2 و GFAP استفاده نمودیم. به طوری که 2×10^5 سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند، ۲۴ ساعت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پارفرمالدهید 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 سانتی‌گراد انکوبه شدند و آنتی‌بادی کوئزوگه ثانویه 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 استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (شکل ۱).

جداسازی اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های لوسمی

لنفوبلاستیک به روش اولتراسانتریفیوژ:

رده‌ی Nalm6 (تهیه شده از انستیتو پاستور، ایران) در محیط کشت کامل RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۲ درصد آنتی بیوتیک کشت داده شد و در انکوباتور تحت شرایط ۵CO₂ 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 ۲۴-۴۸ محیط رویی آن‌ها جمع‌آوری شد و به ترتیب ۳۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید، پس از آن اولتراسانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد و در نهایت پلت اگزوزومی حاصل در ۲۰۰ ml PBS حل گردید. و غلظت پروتئین محلول اگزوزومی 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 اگزوزوم ($50 \mu\text{g/ml}$) 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 PBS ۳۷ درجه سانتی‌گراد شستشو شد. در مرحله بعدی PBS تخلیه شد و سلول‌ها در معرض محلول رقیق شده DAPI با اتانول ($1 \mu\text{g/ml}$) (300 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 این رو با توجه به محدودیت دسترسی به سلول‌های CNS، استخراج و شناسایی این سلول‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

از طرفی امروزه نقش اگزوزوم‌ها در وقوع متاستاز در سرطان‌های مختلف به اثبات رسیده است. این میکرووزیکول‌های مشتق از غشاء انواع سلول‌ها به عنوان عوامل جدید ارتقاء رشد تومور و متاستاز سلول‌های سرطانی شناخته شده‌اند (۸). بر اساس نتایج اخیر محققان اگزوزوم‌های مشتق از لوسمی در میکرومحیط مغز استخوان موجب تقویت تکثیر و بقای سلول‌های لوسمیک شده و خون‌سازی طبیعی را مهار می‌کنند (۹). در سرطان مسیرهای سیگنالینگ غیرقابل کنترل می‌شوند و این تنظیم غیرعادی نقش اساسی در سرطان دارد و منجر به تکثیر بیش‌ازحد سلول، مقاومت در برابر آپوپتوز و در نتیجه پیشرفت سرطان می‌شود. بنابراین فعال 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 اگزوزوم‌های 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 اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان خون لنفوبلاستیک بر تکثیر و تغییر بیان ژن‌های Bcl2 و Bax در آستروسیت‌ها با رویکرد بررسی مسیر ضدآپوپتوزی منجر به متاستاز 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 ام‌البنین مشهد و اخذ کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1397.092، استفاده گردید. پس از خرد کردن بافت مغز در PBS و سانتریفیوژ، جهت هضم آنزیمی تریپسین اضافه گردید. به منظور شمارش سلول $2/5$ ml محیط کشت به بافت حاوی سلول افزوده گردید، سپس ۱۰ میکرولیتر تریپان به لو با ۱۰ 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) تعویض محیط گردیدند. سپس توالی از تریپسین کردن سلول‌ها موجب مرگ سایر سلول‌ها گردید درحالی‌که آستروسیت‌ها به طور محکم به سطح فلاسک متصل بودند و در نتیجه خالص‌سازی آستروسیت‌ها انجام گردید. (۱۳).

قرار گرفتند. انکوبه کردیم. سپس ۲ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد، با متانول فیکس، و توسط میکروسکوپ فلورسنت 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 آستروسیت در پلیت ۶ خانه برای ۲۴ ساعت کشت داده شد، سپس یک گروه تحت تیمار با آگروزوم ($50 \mu\text{g/ml}$) و گروه کنترل هیچگونه تیماری دریافت نکرد (۳ بار تکرار برای هر گروه در نظر گرفته شد). ۷۲ ساعت بعد از تیمار جهت استخراج RNA سلول‌ها توسط تراپزول (Parstoos, Iran) لیز شدند و لیزات سلولی پس از انتقال به میکروتیوب‌های DNase/RNase-free بر اساس پروتکل کیت استخراج RNA در طی انکوباسیون و سانتریفیوژهای متوالی با استفاده از کلروفرم، ایزوپروپانول رسوب حاصل در ۲۵ میکرولیتر DEPC water حل گردید و تعیین غلظت کمی RNA به روش نانودراپ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Epoch, BioTek, Winooski, VT, United States) انجام گردید، RNA استخراج شده توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس به cDNA تبدیل می‌شود، در این مرحله جهت سنتز cDNA بر اساس پروتکل از کیت سنتز cDNA (Parstoos, Iran) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Perkin

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{target}} - \text{CT}_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{test sample}} - \Delta\text{CT}_{\text{control sample}}$$

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

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

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
beta Actin	5'CTTCCTTCTCTGGGCATG3'	5'GTCTTTGCGGATGTCCAC3'
Bax	5'TTTGCTTCAGGGTTTCAGTTCGT3'	5'CTCCATGTTACTGTCCAGTTCGT3'
BCL2	5'TCACGTACACTGCCCTGAAG3'	5' CAGATAGGCACCCAGGGTGAT3'

آنالیز آماری:

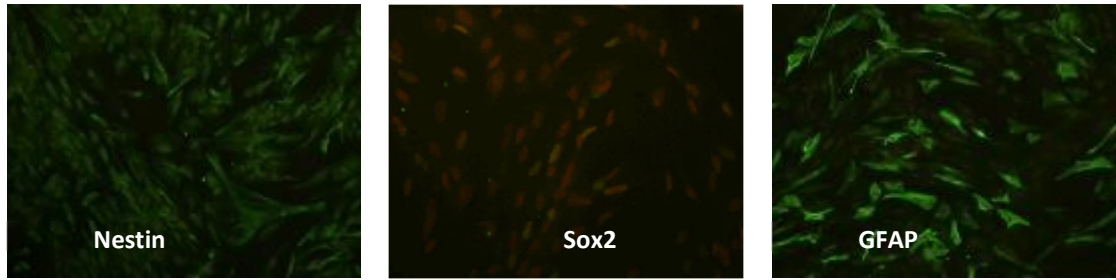
بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 و آزمون واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey در سطح معناداری $P > 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

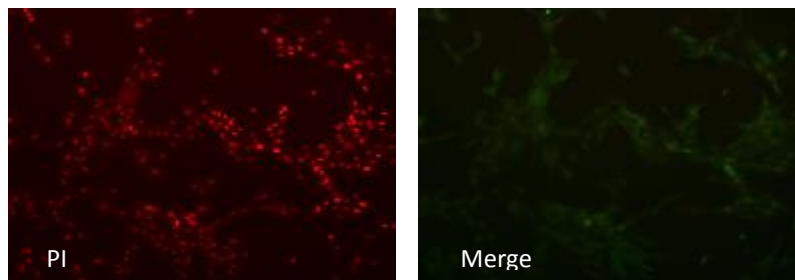
ارزیابی سلول‌های بافت مغز توسط آزمون ایمنونوسیتوشیمی و شناسایی آستروسیت‌ها:

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

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



شکل (۱): ارزیابی اولیه ایمونوسیتوشیمی سلول‌های استخراج شده از بافت مغز توسط آنتی‌بادی‌های Nestin، Sox2، GFAP و عکسبرداری با میکروسکوپ فلورسنت (۱۰۰×).

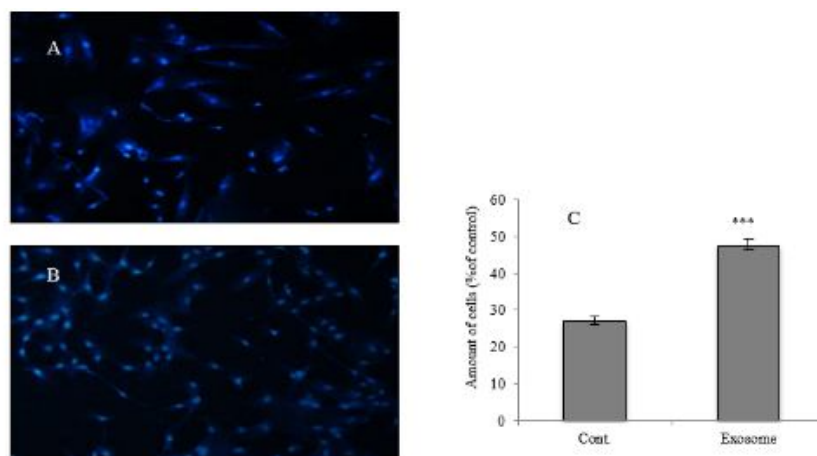


شکل (۲): ایمونوسیتوشیمی (۱۰۰×). تصویر نشان‌دهنده سلول‌های GFAP مثبت است، به ترتیب از چپ به راست هسته رنگ آمیزی شده سلول‌ها با PI (قرمز) و سیتوپلاسم رنگ آمیزی شده با GFAP (سبز رنگ) توسط میکروسکوپ فلورسنت.

۴۸ ساعت پس از تیمار این سلول‌ها توسط آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان خون (۵۰ μg/ml) نشان‌دهنده افزایش معنادار تعداد آستروسیت‌ها نسبت به گروه کنترل (تیمار با PBS) می‌باشد (شکل ۱۱-۴). ($P < 0.001$)

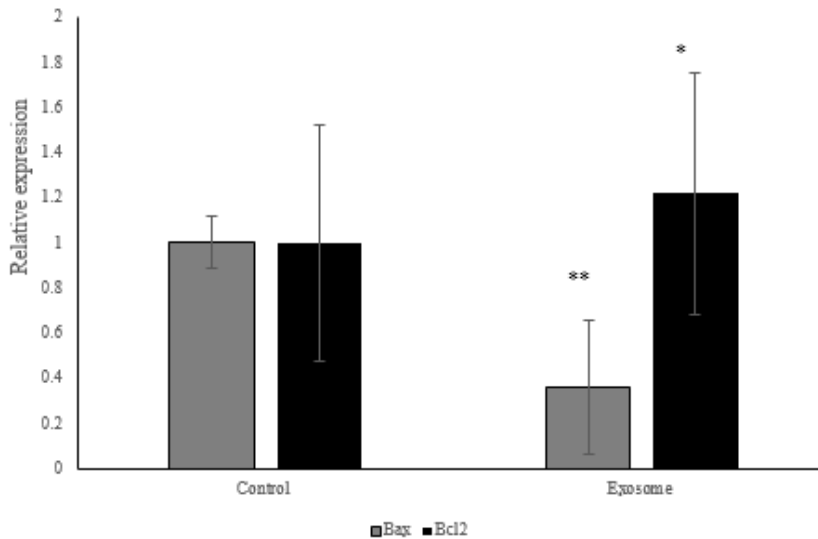
ارزیابی تکثیر آستروسیت‌ها به روش DAPI:

آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های سرطان خون موجب تکثیر آستروسیت‌ها می‌شوند. بر اساس تصاویر به‌دست آمده از آزمون DAPI و بررسی هسته سلول‌های آستروسیت توسط رنگ DAPI،



شکل (۳): سمت چپ تصویر فلورسنت از رنگ آمیزی هسته DAPI نشان‌دهنده اثر آگروزوم‌های سرطانی بر تعداد آستروسیت‌ها می‌باشد، A) گروه کنترل و B) گروه تیمار با آگروزوم (۵۰ μg/ml) (۱۰۰×). نمودار سمت راست نشان‌دهنده افزایش معنادار در تعداد آستروسیت‌ها نسبت به گروه کنترل تحت اثر آگروزوم‌ها بوده است ($P < 0.001$) (c).

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



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

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

شکل (۴): آنالیز بیان ژن توسط Real time PCR. آستروسیت‌های تیمار شده با آگزوزوم‌های سرطان خون ($50 \mu\text{g/ml}$) 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 آگزوزوم 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 ایمنونوسیتوشیمی جهت شناسایی آستروسیت‌های استخراج شده از بافت مغز استفاده نمودیم (۲۳) و (۲۴).

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

آگزوزوم‌های مشتق از تومور می‌توانند تکثیر سلول‌های سرطانی را تحریک کنند، به‌طوری‌که آگزوزوم‌های 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 مانند 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 عصب 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 ($P < 0.01$ و $P < 0.05$). از آنجاکه تحقیقات کمی بر روی اثرات احتمالی آگزوزوم‌های سرطان خون در آستروسیت‌ها صورت گرفته است، در آینده نزدیک با بررسی‌های دقیق مسیرهای مولکولی منجر به متاستاز از طریق آگزوزوم‌های سرطانی می‌توان از آن‌ها به‌عنوان 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 آگزوزوم‌ها ی سرطانی موجب محدودیت در انجام سایر بررسی‌های آزمایشگاهی و همچنین تکرارپذیری آزمون‌های انجام شده گردید.

بر اساس نتایج این پژوهش آگزوزوم‌های سرطان خون از مسیر ضد آپوپتوز در این سلول‌ها با تغییر در بیان ژن‌های Bcl2 و Bax 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 آگزوزوم‌های 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 ام‌البنین مشهد که ما را در این پروژه یاری نمودند قدردانی می‌گردد. نتایج این پژوهش بخشی از رساله دکتری 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 آگزوزوم‌های سرطانی نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.01$). بنابراین با توجه به حضور بیشمار آستروسیت‌ها در CNS و از آنجاکه تکثیر سلولی یکی از نشانه‌های سرطان است، احتمالاً آگزوزوم‌های سرطانی نقش موثری در پیشرفت سرطان دارند.

آگزوزوم‌های مشتق از سرطان خون لنفوبلاستیک با فعال شدن مسیر ضد آپوپتوزی موجب تکثیر و بقا در این سلول‌های توموری می‌گردند (۲۸). همچنین بر اساس نتایج مطالعه‌ی دیگری در شرایط *in vivo* پس از تیمار موش‌ها با آگزوزوم‌های 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 کاهش پروتئین‌های آپوپتوزی از جمله Bax موجب بقای سلول‌های سرطانی می‌شوند (۳۰). بر هم خوردن تعادل بین بیان ژن‌های ضد آپوپتوز و پیش برنده‌ی آپوپتوز یکی از دلایل شروع و گسترش سرطان است، که در این بین Bcl2 به‌عنوان مهار کننده‌ی آپوپتوز با برهمکش با ژن‌های پیش برنده‌ی آپوپتوز نظیر Bax موجب مهار آپوپتوز می‌شود که در سرطان‌های مختلف گزارش شده است (۳۱). در پژوهش حاضر بیان ژن‌های Bcl2 و Bax به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های آپوپتوز و مرگ سلولی در مسیر سیگنالینگ آپوپتوز، در آستروسیت‌های تحت تیمار با آگزوزوم‌های 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 آگزوزوم‌های سرطانی میزان بیان ژن Bax دارای کاهش معنادار و میزان بیان ژن

References:

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 2011;144(5):646-74.
- 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
- Berghoff AS, Preusser M. The inflammatory microenvironment in brain metastases: potential treatment target? *Chin Clin Oncol* 2015;4(2):21.
- Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem* 2007;101(2):555-65.
- 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- κ B ligand pathway. *Cell Metab* 2015;22(1):77-85.
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front Immunol* 2016;7:160.
- 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 Dalooi 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. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015;523(7559):177-82.
 23. Şovrea 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 Shahrokhadi⁴

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 trypsinase. 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 ($p < 001$). 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 euroscience Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran and Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

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