

A Suicide-inducing Vector Carrying the Oct-4 Promoter for Eradication of the AGS Cancer Cell Line

Roshanak Najafi¹, Majid Sadeghizadeh^{2*}, Seyed Javad Mowla³

1- Ph.D. Candidate, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir*

Received: 18/Oct/2011, Accepted: 23/Dec/2011

Abstract

Objective: In an attempt to develop safer and more effective gene therapy approaches as a realistic treatment for various forms of cancer, researchers are increasingly using tumor-specific promoters (TSP) to drive the expression of the gene of interest and eradicate cancer cells. In this study, for the first time we introduce the Oct-4 promoter as a cancer-specific promoter with a high efficacy.

Methods: We cloned Oct-4 promoter and enhancers into a pGl3 control reporter vector and analyzed the expression of luciferase as a reporter gene in an AGS gastric cell line. Next, we used a suicide-inducing vector that included an Oct-4 promoter and the TK gene in the presence of the non-toxic prodrug, ganciclovir, to eradicate cancer cells. Cells were treated with PI and connexin V. FACS analysis was conducted to assess the effect of the system on cell cycle and apoptosis induction.

Results: Under the activity of the Oct-4 promoter, luciferase expression was three-fold higher than the SV40 promoter. The HSV/TK/GCV system activated by the Oct-4 promoter and enhancers induced apoptosis (86.17%) in the AGS cell line. We verified that this system induced S-phase/G2-phase cell cycle arrest in the AGS cell line.

Conclusion: These data indicate that the Oct-4 promoter is active in the AGS cell line. Oct-4 gene is expressed in a wide variety of tumors but not in normal cells. Thus, Oct-4 appears to be a promising tumor-specific promoter for numerous tumors.

Keywords: Cancer Stem Cells, Thymidine Kinase, Ganciclovir, Luciferase, Oct-4

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 61-72

ناقل حاوی پروموتور Oct4 برای القای مرگ سلولی به رده سلول سرطانی AGS

روشنک نجفی^۱، مجید صادقی زاده^{۲*}، سیدجواد مولی^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی

Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۰۳

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۲۷

چکیده

هدف: برای ایجاد راه کارهای ژن درمانی مؤثرتر و ایمن تر به عنوان یک درمان واقع بینانه، پروموتورهای ویژۀ توموری برای القای بیان ژن مورد نظر و نابودی سلول های سرطانی استفاده می شود. در این تحقیق برای اولین بار پروموتور Oct4 به عنوان یک پروموتور ویژۀ توموری با کارایی بالا معرفی شد.

مواد و روش ها: در این تحقیق پروموتور و تشدید کننده های Oct4 در ناقل گزارشگر pGL3 کنترل کلون شد و بیان لوسیفراز به عنوان یک ژن گزارشگر در رده سلولی گاستریک (AGS) بررسی شد. سپس از ناقل القا کننده مرگ که دارای پروموتور Oct4 و ژن TK (تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس) است به همراه پیش داروی گانسایکلوویر استفاده شد و پس از تیمار سلولی به کمک رنگ پروپیدیم آیوداید و کیت کانکسین، تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری برای بررسی مرگ برنامه ریزی شده سلولی و اثر این سیستم روی چرخه سلولی انجام شد.

نتایج: بیان لوسیفراز تحت فعالیت پروموتور ژن Oct4 سه برابر پروموتور SV40 است. تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری نشان داد تحت پروموتور Oct4، سیستم HSV/TK/GCV ۸۶/۱۷ درصد مرگ برنامه ریزی شده سلولی و درصد اندکی نکروز در رده سلولی گاستریک القا می کند. این سیستم چرخه سلولی را در فاز S/G2 متوقف می سازد.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد که پروموتور Oct4 در رده سلولی سرطانی گاستریک فعال است و به علت بیان ژن Oct4 در تعدادی از رده های سلولی سرطانی و عدم بیان آن در سلول های طبیعی، پروموتور آن می تواند به عنوان یک پروموتور ویژۀ توموری در انواع تومورها به کار رود.

کلیدواژگان: سلول های بنیادی سرطانی، تیمیدین کیناز، گانسایکلوویر، لوسیفراز، Oct4

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۶۱-۷۲

مقدمه

نئوپلاسم (Neoplasm) بافتی است حاوی جمعیت هتروژنی از سلول هایی که از نظر ویژگی های زیست شناختی متفاوت اند و پتانسیل خودبازسازی دارند [۱]. بر طبق مدل تکامل کلونال سلول های توموری سرطان از طریق تجمع

تغییرات ژنتیکی در سلول ها و انتخاب تدریجی کلون های موجود ایجاد می شوند. اغلب روش های درمانی مرسوم برای نابودی سلول های سرطانی، برپایه این تئوری طراحی می شود [۲]. محدودیت این روش ها از جمله پیش آگهی ضعیف برای بیمارانی که در مراحل پیشرفته سرطان قرار دارند، این پیشنهاد

بنیادی جنینی حیاتی است و هرگونه افزایش یا کاهش در بیان آن، سرنوشت سلول را تغییر می‌دهد و در روند ایجاد سرطان دخیل است. لازم به ذکر است که ویژگی‌های گفته شده ناشی از فعالیت Oct-4A است و Oct-4B در ایجاد خاصیت بنیادی دخیل نیست و به هنگام بررسی بیان این ژن در بافت‌های مختلف باید به این موضوع توجه داشت. تاکنون گزارشی مبنی بر بیان Oct4 در سلول‌های تمایز یافته ارایه نشده است [۷، ۸].

بسیاری از تحقیقات اخیر نشانگر بیان ژن OCT4 در سطح پروتئین در سرطان‌های مثانه، سینه، پانکراس و استئوسارکوما (Osteosarcoma) است. علاوه بر آن؛ تای (Tai) و همکارانش حضور OCT4 را در چندین رده سلول‌های سرطانی از جمله سرطان کبد، کلیه، گاستریک و دهانه رحم و استخوان تأیید کرده‌اند. این در حالیست که این ژن در سلول‌های طبیعی بیان نمی‌شود و همین امر آن را به عنوان یک کاندید بسیار مناسب معرفی می‌کند [۸-۱۱].

ژن‌درمانی از طریق نسخه‌برداری هدف‌گیری شده (Transcriptional Targeting) برپایه به‌کارگیری پروموتورهای ویژه توموری (Tumor Specific Promoters) یا ویژه بافتی است که می‌تواند بیان ژن‌های درمانی را در یک بافت ناهمگون (هترولوگ) مستقیماً به تومور محدود کند. یک ژن‌درمانی مؤثر نیازمند بیان ژن مورد نظر در تومور و عدم بیان آن در بافت‌های طبیعی به‌ویژه کبد است. ترکیبی از این دو ویژگی می‌تواند منجر به افزایش شاخص درمانی و محدودیت سمیت ناقل‌ها و ترانس‌ژن‌ها در حالت درون بدنی (In vivo) شود. تاکنون بسیاری از پروموتورها به منظور ژن‌درمانی از طریق نسخه‌برداری هدف‌گیری شده مورد آزمایش قرار گرفته است. از آن جمله می‌توان به پروموتور آلفا-فتوپروتئین (Alpha Fetoprotein Promoter: AFP) برای کارسینومای کبدی، پروموتور آنتی‌ژن ویژه پروستات (Prostate-Specific Antigen: PSA) برای سرطان پروستات و به تازگی پروموتور سیکلوآکسیژناز-۲ (Cyclooxygenase 2: Cox-2) برای سرطان روده‌ای-معدی، پروموتور میدکاین (MidKine) برای تومور

را مطرح کرد که سلول‌های توموری حاوی جمعیتی از سلول‌ها هستند که مسئول آغاز رشد و گسترش تومور و نیز توانایی ایجاد متاستاز و عود مجدد تومور هستند. به دلیل شباهت‌هایی که میان این سلول‌ها و سلول‌های بنیادی وجود داشت، سلول‌های بنیادی سرطانی (Cancer Stem Cells: CSCs) نام‌گذاری شدند. این مدل ویژگی‌های زیر را برای CSCs تخمین می‌زند: (۱) خودبازتوانی (۲) هتروژن بودن، مانند پتانسیل تمایز یابی چندجهتی (۳) مقاومت به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis). به نظر می‌رسد که این ویژگی‌ها منجر به کاهش تأثیر درمان‌های مرسوم می‌شود که بیشتر روی سلول‌های توموری تمایز یافته یا در حال تمایز عمل می‌کند. جمعیت سلول‌های بنیادی تمایز نیافته، کسر اندکی از توده توموری را تشکیل می‌دهند. نظریه CSC تخمین می‌زند که این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی یا سلول‌های پروژنیاتور (سلول‌های پیشرو: Progenitor Cells) که تاحدی تمایز یافته‌اند و پتانسیل تکثیر محدود دارند، ایجاد شده‌اند [۳].

مطالعات اخیر بیانگر آن است که فاکتورهای رونویسی خاص سلول‌های بنیادی جنینی مانند Oct4 و Nanog نقش بسیار مهمی در پایداری عملکرد CSC ها ایفا می‌کند و برای مهار تکثیر این سلول‌ها اهداف بسیار مهمی به شمار می‌آید. به طور مثال Oct4 به عنوان یک نشانگر سلول‌های بنیادی جنینی در سرطان مثانه و سینه به میزان زیادی بیان می‌شود [۴، ۵]. اما در حال حاضر گزارش‌های اندکی مبنی بر استفاده از پروموتورهای ویژه توموری برای از بین بردن CSC ها وجود دارد در نتیجه باید بررسی‌های جامع‌تری در این زمینه صورت پذیرد [۶].

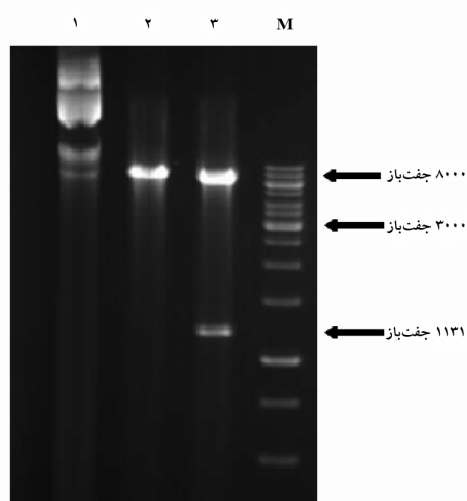
Oct4 عضوی از خانواده فاکتورهای رونویسی متصل شونده چهارتایی است و از طرفی بیان این ژن در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ نیز به تأیید رسیده است و نقشی حیاتی در حفظ خاصیت پرتوانی (Pluripotency) و بازتوانی آن‌ها ایفا می‌کند. این فاکتور در سطحی خاص، برای حفظ خاصیت خودبازسازی (Self-Renewal) سلول‌های

ویلمز (Wilms) یا نوروبلاستوما (Neuroblastoma) و پروموتور CXCR4 برای سرطان سینه و ملانوما (Melanoma) اشاره کرد [۱۱-۱۵].

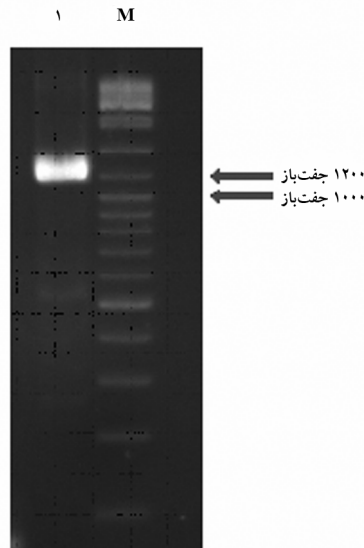
استراتژی ژن درمانی سرطان از طریق نسخه برداری هدف گیری شده زیان هایی را نیز به دنبال دارد. به عنوان مثال پروموتور CXCR4 در بسیاری از سرطان های سینه افزایش بیان دارد، از طرفی ژن CXCR4 به طور قابل ملاحظه ای در انواع لوکوسیت ها از جمله در لنفوسیت های خون محیطی، مونوسیت ها، سلول های پیش ساز B و سلول های دندریتیک بیان می شود [۱۱].

هدف اصلی این تحقیق یافتن یک پروموتور ویژه توموری

است که در طیف گسترده ای از تومورها بیان شود و درعین حال در بافت های طبیعی بیان نداشته باشد. تحقیقات اخیر نمایانگر آن است که ژن های فاکتورهای رونویسی مانند Nanog, OCT4 و SOX2 که در حفظ ویژگی های سلول های بنیادی نقش اساسی دارند، در سلول های سرطانی و CSC ها بیان بالایی دارند و در سلول های تمایز یافته و طبیعی بیان نمی شوند، کاندیدهای مناسبی به شمار می آیند [۱۶، ۱۷]. در تحقیق حاضر برای اولین بار پروموتور ژن Oct-4 به عنوان یک پروموتور ویژه توموری به همراه سیستم ژن درمانی وابسته به خودکشی (Suicide Gene Therapy) در رده سلولی گاستریک AGS و رده سلولی طبیعی فیبروبلاستی جنین موش بررسی شده است.



شکل ۲ تأیید درستی پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK با روش هضم تک آنزیمی و دو آنزیمی؛ (M) DNA نشانگر، (۱) پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK هضم شده با آنزیم های EcoRI و BamHI، (۲) پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK هضم شده با آنزیم BamHI، (۳) پلاسمید pGL3/Oct4 promoter/TK



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR ژن TK/HSV روی ژل ۱ درصد؛ (M) DNA نشانگر ۱ جفت بازی، (۱) محصول PCR ژن TK/HSV (۱۱۳۱ جفت بازی)

مواد و روش ها

ساخت پلاسمیدها

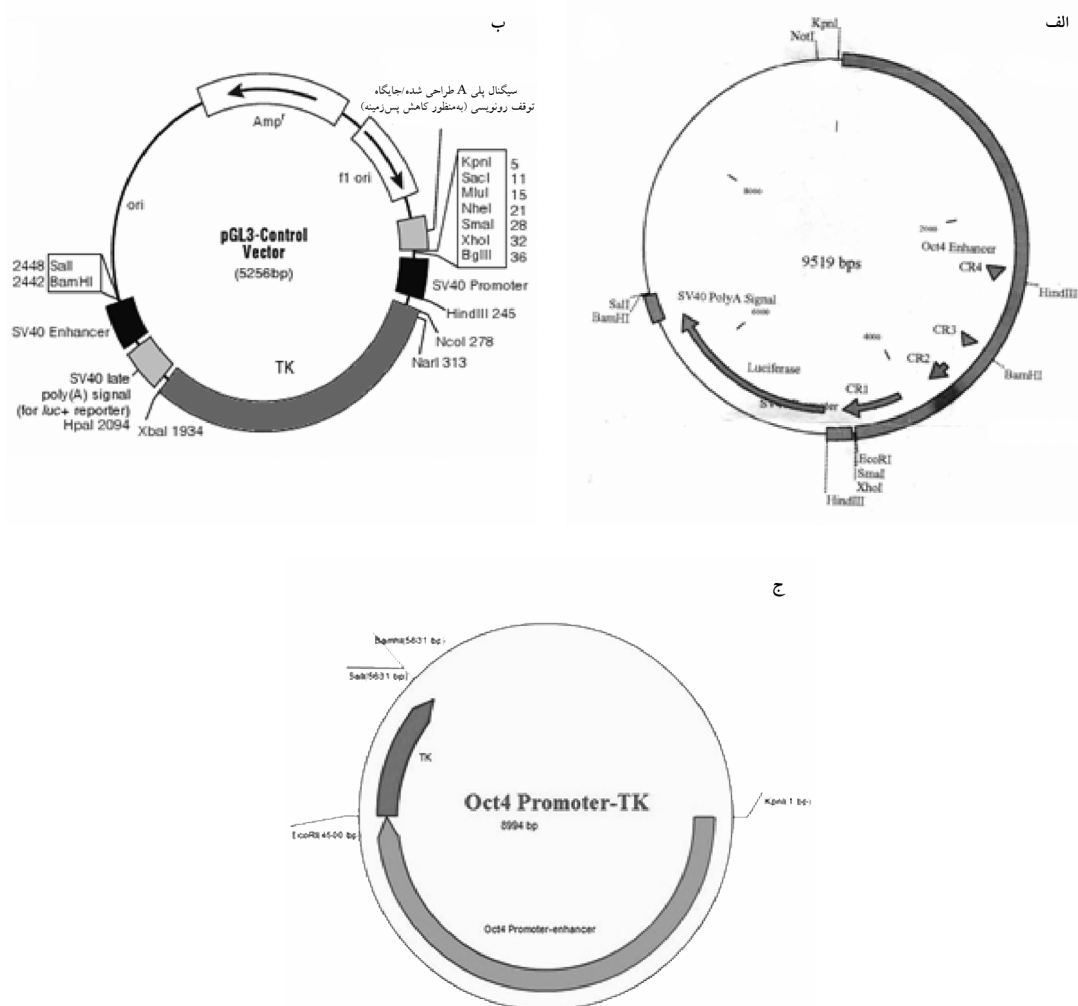
ژن تیمیدین کیناز ویروس هرپس سیمپلکس به منظور کلونینگ در ناقل pGL3-control با استفاده از آغازگرهای پیشرو

(Forward) 5' TACCCATGGCTTCGTACCCC 3' و پیرو 3' CCGTCTAGATCAGTTAGCCT 5' و با استفاده از پلاسمید حاوی این ژن که از انستیتو پاستور تهیه شده بود به عنوان نمونه اصلی به کمک PCR تکثیر شد و محصول حاصل روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و باند اختصاصی

ناقل حاوی پروموتور Oct4 جهت القای مرگ سلولی

SV40 ناقل pGL3 کلون شد (شکل ۳ ب). ناقل حاوی پروموتور-افزاینده ژن Oct4 و نیز ژن گزارشگر لوسیفراز هدیه ارزشمنندی از جانب دکتر یوسوکه ماریکاوا (Yusuke Marikawa) بود (شکل ۳ الف). درستی توالی ژن تیمیدین کیناز با تعیین توالی این ژن توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) تأیید شد. لازم به ذکر است که کلیه پلاسمیدهای مورد نیاز برای انتقال به سلول‌ها با کیت استخراج پلاسمید Endotoxin-free مربوط به شرکت Qiagen آلمان استخراج شد.

۱۱۳۱ جفت‌بازی مشاهده شد (شکل ۱). محصول PCR پس از تکثیر و مشاهده روی ژل آگارز با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل تخلیص شد. سپس در ناقل کلونینگ TA کلون شد (کیت کلونینگ PCR InsTAclone™، شرکت Fermentas کانادا) و پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های BamHI و HindIII به ناقل حاوی پروموتور و افزاینده (Enhancer) ژن Oct4 ساب‌کلون شد (شکل ۲ و ۳ ج). از طرف دیگر ژن تیمیدین کیناز پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های XbaI و NcoI در ناحیه پایین دست پروموتور



شکل ۳ نقشه ناقل‌ها؛ الف) پلاسمید حاوی Oct4 promoter-enhancer/Luc (هدیه از دکتر یوسوکه ماریکاوا) ب) پلاسمید pGL3 حاوی ژن TK، ج) پلاسمید حاوی پروموتور-افزاینده ژن Oct4 و ژن TK

کشت رده سلولی

رده سلولی سرطانی AGS در محیط RPMI حاوی گلوکز بالا به همراه FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتومایسین (Streptomycin) کشت داده شد (تماماً از محصولات شرکت Invitrogen/GIBCO آمریکا). سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلول و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شدند. پس از این که سلول‌ها به تراکم ۷۰ درصد رسیدند ناقل‌های مختلف به وسیله لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamin 2000) به آن‌ها ترانسفکت شد.

تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتور ژن Oct4

به منظور بررسی کارایی پروموتور Oct-4، ابتدا $10^4 \times 100$ سلول در فلاسک ۶ چاهکی کشت داده شد و پس از این که به تراکم بالای ۹۰ درصد رسیدند، سازه pGL3/Oct4/Luc و سازه pGL3-control به عنوان کنترل مثبت با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ شرکت Invitrogen (آمریکا) به رده‌های سلولی ذکر شده ترانسفکت شد. پس از ۳۰ ساعت میزان بیان لوسیفراز با دستگاه لومینومتر (Luminometer) بررسی و آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

تشخیص مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

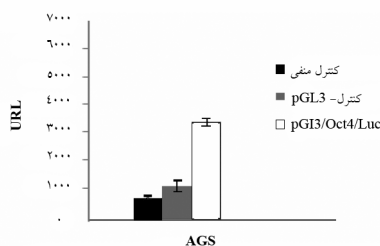
$10^4 \times 100$ سلول از رده سلولی AGS در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند، ۲۴ ساعت بعد پلاسمیدهای Oct-4 promoter/TK1 و pGL3/TK1 از طریق لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به آن‌ها ترانسفکت شد. در مرحله بعد پس از گذشت ۳۰ ساعت، داروی گانسایکلوویر (Ganciclovir) با غلظت‌های ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. ۷۲ ساعت بعد سلول‌ها پس از ترپسینه شدن با پروپیدیم آیوداید (Propidium Iodide) و آنکسین V (Annexin V) رنگ‌آمیزی شدند تا میزان سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز و نیز آثار این سیستم روی چرخه سلولی مشخص شود. در هر فلوسایتومتری

۱۰ هزار سلول بررسی شد (Becton-Dickinson) (آمریکا).

نتایج

تجزیه و تحلیل فعالیت پروموتور Oct4 به وسیله ژن گزارشگر لوسیفراز

برای بررسی فعالیت پروموتور ژن Oct4 در رده سلولی سرطانی AGS، پلاسمید pGL3/Oct4promoter-enhancer و ناقل گزارشگر pGL3 که حاوی پروموتور SV40 است به رده سلولی مذکور ترانسفکت شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بیان لوسیفراز تحت فعالیت پروموتور ژن Oct4 ۳ برابر بیشتر از پروموتور SV40 است (نمودار ۱). فعالیت آنزیم لوسیفراز با آزمون T مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.



نمودار ۱ بررسی فعالیت لوسیفراز تحت پروموتور Oct4 در رده‌های سلولی AGS (کنترل منفی رده سلولی سرطانی بدون تیمار است).

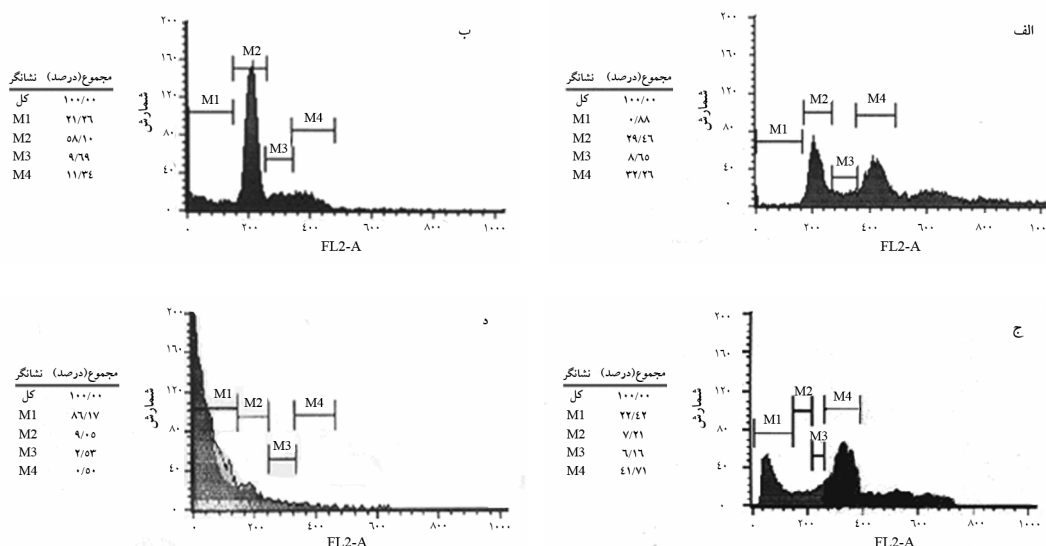
تجزیه و تحلیل چرخه سلولی رده‌های سلولی ترانسفکت شده با کمک روش فلوسیتومتری پس از تیمار با پیش داروی گانسایکلوویر

برای بررسی کارایی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی توسط پروموتور ژن Oct4، دو کنترل استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که مرگ برنامه‌ریزی شده القا شده توسط پروموتور ژن Oct4 ۴ برابر پروموتور SV40 است (نمودار ۲). پس از ترانسفکت ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK1 و تیمار با

ناقل حاوی پروموتور Oct4 جهت القای مرگ سلولی

نشانگر اثر مهارى سیستم HSV-tk1/GCV بر مراحل S و G2 چرخه سلولى بود (نمودار ۳).

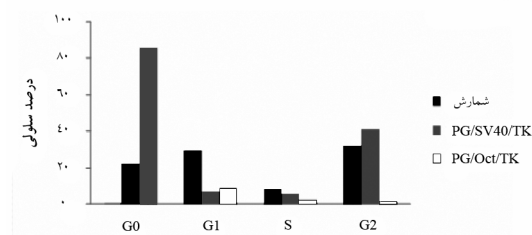
گانسایکلوویر، کاهش قابل ملاحظه‌ای در درصد سلول‌های موجود در مرحله S و G2 چرخه سلولى مشاهده شد که



نمودار ۲ هیستوگرام فلوسایتمتری از تأثیر تیمار سلول‌های AGS (با منشأ آدنوکارسینومای معده) با گانسایکلوویر بر فازهای مختلف چرخه سلولی؛ M1 سلول‌های موجود در فاز مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، M2 سلول‌های موجود در فاز G0/G1، M3 سلول‌های موجود در فاز S، M4 سلول‌های موجود در فاز G2، الف) سلول‌های سرطانی بدون تیمار (کنترل مثبت)، ب) سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با pGL3/TK بدون تیمار با دارو، ج) سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با pGL3/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر، د) سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر

سلولی را در همان مراحل اولیه توسط روش ساده فلوسیتومتری سنجید. این روش میان سلول‌های دچار مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptotic Cells) و سلول‌های دچار نکروز (Necrotic Cells) تمیز قابل نمی‌شود، به همین دلیل این روش به همراه رنگ‌آمیزی با PI استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های موجود در فاز تأخیری (Late) مرگ برنامه‌ریزی شده و سلول‌های دچار نکروز بیشتر از سلول‌های موجود در فاز زودهنگام (Early) مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و به ترتیب ۴۲ و ۱۸ درصد است (نمودار ۴).

برای اطمینان از این موضوع که سازه حاوی ژن تیمیدین کیناز و پروموتور Oct4 در سلول‌های طبیعی فاقد اثر کشندگی هستند، آزمایش‌های انجام شده روی رده‌های سلول‌های سرطانی روی سلول‌های فیروبلست جنینی موش نیز به انجام رسید

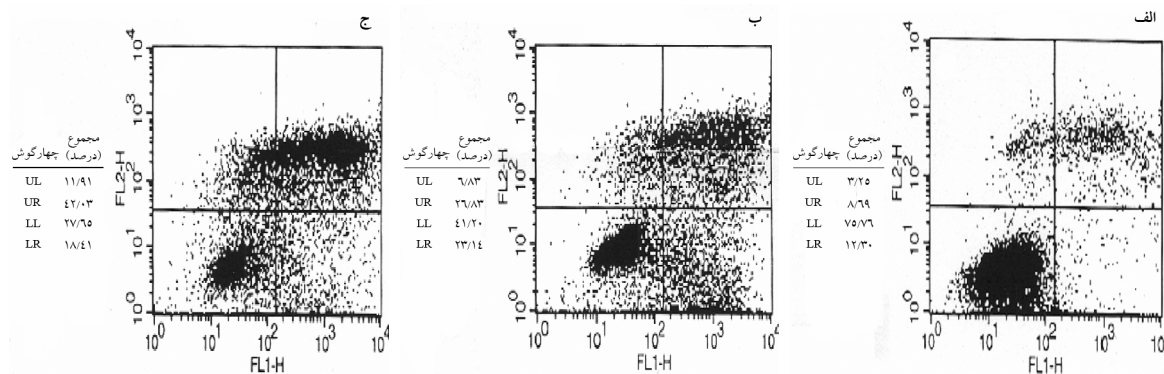


نمودار ۳ مقایسه درصد سلول‌های موجود در مراحل مختلف چرخه سلولی رده سلولی AGS

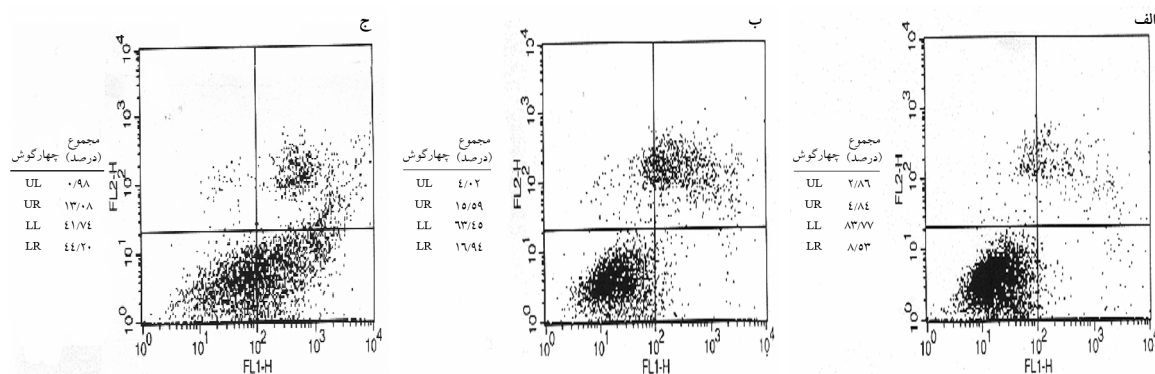
تجزیه و تحلیل مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نکروز به وسیله آنکسین V

با رنگ‌آمیزی FITC-Annexin V (Fluorescein Isothiocyanate) می‌توان فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده

(نمودار ۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود حدود ۲۸ درصد از سلول‌ها در مراحل ابتدایی مرگ برنامه‌ریزی شده قرار دارند.



نمودار ۴ تجزیه و تحلیل مرگ سلولی سلول‌های رده AGS با استفاده از آنکسین V؛ **الف** سلول‌های سرطانی بدون تیمار (کنترل منفی)، **ب** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با pGL3/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر (کنترل مثبت)، **ج** سلول‌های سرطانی ترانسفکت شده با ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK با تیمار دارویی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر



نمودار ۵ تجزیه و تحلیل مرگ سلولی سلول‌های فیروبلست جنین موش با استفاده از آنکسین V

بحث

در حالی که در سلول‌های CD34⁺ هماتوپوئیتیک پیشرو (Hematopoietic Progenitor) فعالیت آن ۱۰۰ بار کمتر است. در نهایت درصد مرگ برنامه‌ریزی شده القا شده به سلول‌های UV2237 (فیروسارکومای موشی) از این طریق پس از ۷۲ ساعت، ۵۸/۲ درصد گزارش شده است [۱۹].

یکی دیگر از تحقیقات انجام شده، استفاده از RNAi (RNA interference) ویژه توموری بیان شده توسط پروموتور سورویوین (Surviving) برای مهار eIF4E است که اخیراً در مجله Breast Cancer Research به چاپ رسیده است. در این

تاکنون روش‌های مختلفی برای القای مرگ برنامه‌ریزی شده به سلول‌های سرطانی به‌کار گرفته شده است. از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از پروموتور ژن hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) برای القای بیان ژن پیش‌آپوپتوزی Bax اشاره کرد که نتایج آن در مجله Nature به چاپ رسیده است. فعالیت این پروموتور هم در سلول‌های طبیعی و هم در سلول‌های بنیادی پیشرو بررسی شده، نتیجه بیانگر فعالیت بالای این پروموتور در سلول‌های سرطانی است

نتایج حاصل از بررسی چرخه سلولی در رده سلولی AGS نشانگر آن است که سیستم HSVtk/GCV با القای توقف چرخه سلولی در مرحله S/G2 منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود که بسته به میزان بیان ژن کانکسین در هر یک از رده‌های سلولی مذکور کارایی این سیستم متفاوت خواهد بود [۲۳]. هرچه بیان ژن Oct4 بیشتر باشد میزان بیان کانکسین کاهش می‌یابد، در نتیجه اگرچه بیان ژن tk در سلول‌ها تحت این پروموتور افزایش می‌یابد اما به دلیل کاهش GJCها (Gap Junctional InterCellular Communication)، مرگ سلولی کمتری مشاهده می‌شود. مرگ سلولی القا شده از طریق این سیستم در رده سلولی AGS هم از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده و هم از طریق نکروز است با تأکید بر این که مرگ برنامه‌ریزی شده نقش غالب را داراست.

در تحقیق حاضر برای اولین بار از پروموتور Oct4 به همراه سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی HSVtk/GCV استفاده شد، ضمن این که برای اولین بار فعالیت این پروموتور در رده سلولی سرطانی AGS توسط سیستم ژن گزارشگر لوسیفراز (Luciferase Gene Reporter Assay) بررسی شد. پس از تیمار رده‌های سلولی مذکور با گانسایکلوویر و تجزیه و تحلیل مرگ سلولی با استفاده از روش فلوسیتومتری و کیت تشخیصی آنکسین V، ۸۶/۱۷ درصد از سلول‌های رده سلولی سرطانی AGS دچار مرگ برنامه‌ریزی شده شدند. درصد بالای مرگ سلولی در رده سلولی سرطانی AGS به علت بیان بالای کانکسین و در نتیجه افزایش اثرسیستم مجاورتی و بهبود سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی است. بررسی‌های نهایی نشان داد که سیستم HSVtk/GCV با القای توقف چرخه سلولی در مرحله S/G2 منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود و مرگ سلولی حاصل از دو طریق مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز رخ می‌دهد [۲۴].

بیان ژن Oct4 در بسیاری از انواع سرطان‌ها و نیز افزایش بیان آن در سلول‌های بنیادی سرطانی و عدم بیان آن در سلول‌های طبیعی، پروموتور آن را کاندید مناسبی برای استفاده به عنوان یک پروموتور ویژه توموری می‌گرداند؛ زیرا عامل عود مجدد سرطان پس از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، سلول‌های

تحقیق پس از بررسی فعالیت ژن و پروتئین سورویوین و اطمینان از کارا بودن پروموتور آن در چهار رده سلولی کارسینومای سینه، از ناقل pSUPER.retro که دارای shRNA یی (short hairpin RNA) که پس از برش توسط دایسر (Dicer)، mRNA eIF4E را هدف قرار داده و از بین می‌برد، استفاده شده است. آزمون آنکسین V انجام شده نشان دهنده القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی 1.7 ± 1.8 درصد است [۲۰].

بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که ژن‌درمانی وابسته به خودکشی می‌تواند روش مؤثری برای نابودی سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) و درون بدنی (In vivo) باشد؛ با این وجود نتایج کارآزمایی‌های بالینی نیاز به افزایش کارایی این روش را نشان می‌دهد. از جمله استراتژی‌های جدیدی که برای افزایش اثر ضدتوموری این روش پیشنهاد شده است، ترکیب آن با داروهای مختلف یا با ژن درمانی است. در تحقیقی که توسط پارک (Park) و همکارانش در مجله Cancer Letter به چاپ رسید، ترکیبی از ژن درمانی سرطان و ژن‌درمانی وابسته به خودکشی با استفاده از اتصال shRNA ژن MDR (Multidrug Resistance) و سیستم HSVtk/GCV، و شیمی‌درمانی با دوکسوروبیسین (Doxorubicin) به کار گرفته شد که منجر به القای بیش از ۸۰ درصد مرگ سلولی به رده سلول‌های سرطانی کولون مورد مطالعه شد [۲۱]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در مواردی که ژن‌درمانی وابسته به خودکشی تنها با روش شیمی‌درمانی ترکیب می‌شود، tk-GCV به عنوان یک ضد متابولیت ویژه چرخه سلولی برای القای اثر سمی خود با داروهایی که اثر خود را به طور خاص روی چرخه سلولی اعمال نمی‌کنند به رقابت می‌پردازد؛ در نتیجه افزایش محسوسی در کارایی روش‌های درمانی ترکیبی مشاهده نمی‌شود [۲۱، ۲۲].

در تحقیق حاضر از ژن HSV tk به همراه پروموتور ویژه توموری Oct4 استفاده شد. پس از ترانسفکت پلاسمیدهای مورد نظر به رده سلولی سرطانی گاستریک، این سلول‌ها به مدت سه روز با غلظت‌های مختلف داروی گانسایکلوویر تیمار شدند. سپس به منظور بررسی مرگ سلولی از روش فلوسیتومتری و کیت تشخیصی آنکسین V استفاده شد.

بنیادی سرطانی هستند که می‌توان با استفاده از پروموتور این ژن و سیستم ژن‌درمانی وابسته به خودکشی HSVtk/GCV به طور خاص این سلول‌ها را هدف قرار داد و راهی برای ریشه‌کن کردن این بیماری یافت [۴، ۲۵-۳۲].

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از

مسئولین شبکه سلول‌های بنیادی کشور و دانشگاه تربیت مدرس که کلیه هزینه‌های این طرح را تأمین نموده‌اند، ابراز می‌دارند. همچنین از خانم حیات در بخش تحقیقات مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام آزمایش‌های فلوسایتومتری ما را یاری کردند، سپاسگزاری می‌شود. ناقل pGL3/Oct4 promoter/TK با شماره ۳۹۰۱۱۰۷۷۷/۷۵۲۹۷ در سازمان مالکیت‌های صنعتی ثبت اسناد و املاک کشور به ثبت رسیده است.

منابع

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.
- [2] Clarke MF, Becker MW. Stem cells: the real culprits in cancer? *Sci Am* 2006; 295(1): 52-9.
- [3] Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 2007; 25(3): 707-11.
- [4] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007; 120(7): 1598-602.
- [5] Ezech UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005; 104(10): 2255-65.
- [6] Bauerschmitz GJ, Ranki T, Kangasniemi L, Ribacka C, Eriksson M, Porten M, Herrmann I, Ristimäki A, Virkkunen P, Tarkkanen M, Hakkarainen T, Kanerva A, Rein D, Pesonen S, Hemminki A. Tissue-specific promoters active in CD44+CD24-/low breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68(14): 5533-9.
- [7] Ashok KA, Reddy KVR. Oct-4: More than a pluripotent marker? *Yakhteh Med J* 2009; 11(1): 1-12.
- [8] Asadi MH, Mowla SJ, Fathi F, Aleyasin A, Asadzadeh J, Atlasi Y. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. *Int J Cancer* 2011; 128(11): 2645-52.
- [9] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 495-502.
- [10] Minucci S, Botquin V, Yeom YI, Dey A, Sylvester I, Zand DJ, Ohbo K, Ozato K, Scholer HR. Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo. *EMBO J* 1996; 15(4): 888-99.
- [11] Levings PP, McGarry SV, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC, Steindler DA, Gibbs CP. Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. *Cancer Res* 2009; 69(14): 5648-55.
- [12] Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer

- by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(7-8): 554-71.
- [13] Nettelbeck DM, Jérôme V, Müller R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet* 2000; 16(4): 174-81.
- [14] Lee SE, Jin RJ, Lee SG, Yoon SJ, Park MS, Heo DS, Choi H. Development of a new plasmid vector with PSA-promoter and enhancer expressing tissue-specificity in prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2000; 20(1A): 417-22.
- [15] Yamamoto M, Alemany R, Adachi Y, Grizzle WE, Curiel DT. Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol Ther* 2001; 3(3): 385-94.
- [16] Adachi Y, Reynolds PN, Yamamoto M, Wang M, Takayama K, Matsubara S, Muramatsu T, Curiel DT. A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7882-8.
- [17] Liu J, Leina M, Yigang W, Yuan LX, Qijun Q. A novel strategy for cancer treatment: targeting cancer stem cell. *Chin Sci Bull* 2008; 53(12): 1777-83.
- [18] Seigel GM, Hackam AS, Ganguly A, Mandell LM, Gonzalez-Fernandez F. Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. *Mol Vis* 2007; 13: 823-32.
- [19] Gu J, Andreeff M, Roth JA, Fang B. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity. *Gene Ther* 2002; 9(1): 30-7.
- [20] Zhu ZB, Makhija SK, Lu B, Wang M, Kaliberova L, Liu B, Rivera AA, Nettelbeck DM, Mahasreshti PJ, Leath CA, Barker S, Yamaoto M, Li F, Alvarez RD, Curiel DT. Transcriptional targeting of tumors with a novel tumor-specific survivin promoter. *Cancer Gene Ther* 2004; 11(4): 256-62.
- [21] Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53(21): 5274-83.
- [22] Cao D, Pizzorno G. Uridine phosphorylase: an important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation. *Drugs Today (Barc)* 2004; 40(5): 431-43.
- [23] Wei SJ, Chao Y, Hung YM, Lin WC, Yang DM, Shih YL, Ch'ang LY, Whang-Peng J, Yang WK. S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp Cell Res* 1998; 241(1): 66-75.
- [24] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2007; 28(1): 4-41.
- [25] Kim RJ, Nam JS. OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. *Lab Anim Res* 2011; 27(2): 147-52.
- [26] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML,

- Lee YY, Ku HH, Chiou SH. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* 2008; 3(7): e2637.
- [27] Tasciotti E, Giacca M. Fusion of the human immunodeficiency virus type 1 tat protein transduction domain to thymidine kinase increases bystander effect and induces enhanced tumor killing in vivo. *Hum Gene Ther* 2005; 16(12): 1389-403.
- [28] Chang CC. Recent translational research: stem cells as the roots of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8(1): 103.
- [29] Du Z, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, Cao X, Ling EA, Hao A. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 2009; 57(7): 724-33.
- [30] Kasper S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev* 2008; 4(3): 193-201.
- [31] Ailles L, Prince M. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods Mol Biol* 2009; 568: 175-93.
- [32] Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AL. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 2008; 3(6): e2428.