

Anti-cancer effect of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor on NB4 leukemic cells

Delshad M., MSc¹, Safaroghli-Azar A., MSc¹, Bashash D., PhD²

1. Department of Hematology and Blood banking, School of Allied Medicine sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-21-22721150, d.bashash@sbmu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: In the last decades, experimental studies have shown that aberrant activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway is an essential step for both initiation and maintenance of tumorigenesis in a wide range of human cancers, such as, acute promyelocytic leukemia (APL). In this study, we investigated the cytotoxic effect of BKM120, a pan-PI3K inhibitor, on APL-derived NB4 cells.

Material and Methods: To evaluate the inhibitory effect of BKM120 on PI3K/Akt pathway, we analyzed the expression and phosphorylation level of Akt using western blot. Using western blot, phosphorylation rate of Akt was evaluated. In order to evaluate the effect of the inhibitor on the metabolic activity, apoptosis index and alteration of the expression of apoptotic-related genes, we used MTT assay, annexin-V/PI staining and RT-PCR analysis respectively. Using SPSS 17 software data were analyzed by t-test.

Results: We found that inhibition of PI3K/Akt pathway by BKM120 resulted in reduction of metabolic activity of APL-derived NB4 cells in a dose- and time-dependent manner ($p \leq 0.001$). Moreover, the results obtained from flowcytometry and RT-PCR analysis showed a significant increase in BKM120 induced apoptotic cell death in the inhibitor-treated cells ($p \leq 0.001$). We found BKM120 increased iBax/Bcl-2 transcriptional ratio ($p \leq 0.001$).

Conclusion: BKM-120 exerts a favorable apoptotic effect on NB4 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: Apoptosis, Phosphatidylinositol 3-kinase, Acute promyelocytic leukemia, NB4, BKM120.

Received: Jan 24, 2017 **Accepted:** Aug 12, 2017

اثر ضدسرطانی مهار فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز در رده سلول‌های لوسمیک NB4

مهرداد دلشاد^۱، آوا صفراوغلی آذر^۱، داود بشاش^۲

۱. کارشناسی ارشد خون‌شناسی و بانک خون، گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دکتری تخصصی خون‌شناسی و بانک خون، استادیار گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (مؤلف

مسئول)، تلفن ثابت: ۰۲۱-۲۲۷۲۱۱۵۰، ۰۲۱، d.bashash@sbmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: طی دهه‌های اخیر، مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت ناهنجار مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز (PI3 Kinase) یک مرحله ضروری برای شروع و حفظ تومورزایی در بسیاری از سرطان‌ها از جمله لوسمی پرومیلوسیتی حاد (Acute promyelocytic leukemia) می‌باشد. در این مطالعه، بر آن شدیم تا اثر ضدسرطانی مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K را بر رده سلولی NB4 (برگرفته از APL) مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش بررسی: در این مطالعه، به منظور بررسی میزان فعالیت مسیر PI3K/Akt در سلول‌های NB4 و همچنین ارزیابی تأثیر مهارکننده PI3K در بلوک کردن این مسیر، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از BKM120 تیمار شدند و سپس میزان فسفریلاسیون Akt توسط روش وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه، جهت سنجش تأثیر دارو بر فعالیت متابولیک، شاخص آپوپتوز و تغییر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز به ترتیب آزمون‌های MTT، Annexin-V/PI apoptosis assay و Real Time Quantitative RT-PCR انجام شد. در انتها معنادار بودن یافته‌ها از نظر آماری از طریق روش t-test و با کمک نرم‌افزار SPSS 17 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان داد که مهار مسیر PI3K/Akt توسط BKM120 منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌گردد ($P<0/001$). همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری و RT-PCR نشان داد مرگ سلولی القاء شده در سلول‌های تیمار شده با دارو افزایش چشمگیری داشته است ($P<0/001$) و بیان mRNA ژن Bax نسبت به Bcl-2 افزایش داشته است ($P<0/001$).

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این مطالعه حاکی از اثر آپوپتوتیک مطلوب BKM-120 از طریق مهار مسیر PI3K/Akt روی سلول‌های رده NB4 می‌باشد.

کلید واژه‌ها: آپوپتوز، فسفاتیدیل-۳ کیناز، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، NB4، BKM120.

وصول مقاله: ۹۵/۱۱/۵ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۴/۱۱ پذیرش: ۹۶/۵/۲۱

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL)، با تشکیل دادن ۱۵-۵ موارد لوسمی میلوئیدی، به یکی از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین انواع بدخیمی‌های هماتولوژیک بالغین تبدیل شده است (۱). در طی سال‌های گذشته، بررسی‌های ژنتیکی و آزمایشگاهی مختلفی روی پاتوژنز و مکانیسم‌های دخیل در بروز این بدخیمی صورت گرفته که براساس آن‌ها، جابه‌جایی بین دو کروموزوم ۱۵ و ۱۷ و ایجاد پروتئین کایمربک PML/RAR α به عنوان مهم‌ترین شاخصه این لوسمی معرفی شده است (۲) با این وجود، تلاش برای یافتن مکانیسم‌های دیگری که هم در پاتوژنز بیماری و هم در ساز و کارهای ایجاد مقاومت نسبت به داروهای شیمی‌درمانی تاثیرگذار هستند، همچنان ادامه دارد (۳). در بین مسیرهای انتقال پیام متعدد، فعال شدن نابه‌هنجار مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt در بسیاری از بیماران مبتلاء به AML گزارش شده است (۴). اهمیت فعالیت بیش از حد این مسیر در این لوسمی هنگامی بیش‌تر شد که بسیاری از مطالعات نشان دادند، مسیر PI3K/Akt علاوه بر نقشی که در گریز از آپوپتوز و بقاء بلاست‌های بدخیم ایفا می‌کند؛ عامل اصلی مقاومت به درمان‌های رایج در APL نیز می‌باشد (۵).

مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt نقش مهمی را در تکثیر، تنظیم چرخه سلولی و همچنین مهار آپوپتوز بازی می‌کند. این مسیر از اجزاء و مولکول‌های مختلفی تشکیل شده است که در بین آن‌ها لپیدکیناز PI3K با قرار گرفتن در صدر مسیر انتقال پیام، نقش بسیار پررنگی را در بروز بسیاری از بدخیمی‌ها، از جمله بدخیمی‌های هماتولوژیک ایفا می‌کند (۶). PI3K آنزیمی هترودایمر و دارای دو زیرواحد تنظیمی (p85) و کاتالیتیک (p110) می‌باشد. این لپیدکیناز، متعاقب اتصال لیگاند به گیرنده تیروزین‌کیناز فعال می‌گردد و با تولید پیامبر ثانویه PIP3 منجر به فسفریله شدن Akt و در نتیجه تبدیل آن به فرم فعال می‌گردد (۷). در ادامه، Akt فعال نیز از طریق فسفریلاسیون سوبستراهای زیر دست مختلف، مسیرهای بیولوژی متفاوتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸). مطالعات و

پژوهش‌های متعدد صورت گرفته روی انواع بدخیمی‌ها، بروز موتاسیون‌های فعال‌کننده PI3K را به عنوان یک عامل موثر در پاتوژنز تومورزایی مطرح کرده‌اند. با توجه به اهمیت این مولکول در شروع و بروز تومورزایی، به نظر می‌رسد که مهار این لپیدکیناز بتواند به عنوان یک راهکار درمانی برای طیف وسیعی از بدخیمی‌ها تبدیل شود (۹).

طی سال‌های اخیر، انواع مختلفی از مهارکنندگان PI3K طراحی شده و توانایی آن‌ها در کاهش بقاء سلول‌های نوپلاستیک مورد ارزیابی قرار گرفته‌است. مهارکنندگان PI3K را می‌توان بر اساس نحوه مهار این مولکول به دو دسته مهارکنندگان تمام ایزوفرمی و مهارکنندگان اختصاصی یک ایزوفرم خاص تقسیم‌بندی نمود. در این بین، داروی BKM120 یکی از شاخص‌ترین مهارکنندگان تمام ایزوفرمی PI3K می‌باشد که در حال حاضر به علت ویژگی‌های فارماکودینامیک و فارماکوکینتیک بسیار مطلوب به شدت مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). این مهارکننده یک داروی سنتتیک، خوراکی و قدرتمند است که قادر به مهار تمام ایزوفرم‌های PI3KI (آلفا، بتا، گاما و دلتا) می‌باشد. این مولکول کوچک با ممانعت از اتصال ATP به جایگاه فعال PI3K، منجر به مهار مسیر پیام‌رسانی PI3K می‌شود (۱۱). مطالعات پیش از بالین مشخص کرده است که این دارو نقش ویژه‌ای در سرکوب تکثیر و القاء آپوپتوز در رده‌های سلولی سرطانی و همچنین مهار رشد تومورهای انسانی (زنوگرفت) در موش دارد (۱۲). شواهد نشان داده است که BKM120 با مهار فسفریلاسیون Akt منجر به القاء اثرات آنتی‌پرولیفراتیو و سائتوتوکسیک در بدخیمی‌های مختلف انسانی با منشاء هیستولوژیک متفاوت می‌شود و تا کنون تاثیر این دارو روی رده‌های سلولی مختلفی مانند گلیوبلاستوما (۱۳)، سرطان ریه (۱۴) و سرطان سر و گردن (۱۵) بررسی شده است. شایان ذکر است که مطالعات پیشین از بی‌خطر بودن دوز فارماکولوژیک BKM120 بر سلول‌های نرمال حکایت دارد و هم‌اکنون این مهارکننده در فاز I کارآزمایی بالینی سرطان پستان می‌باشد (۱۶). با توجه به نقش برجسته PI3K در پاتوژنز APL و

همچنین در بروز مقاومت نسبت به بسیاری از داروهای شیمی-درمانی، در این مطالعه سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد NB4 با داروی BKM120 به عنوان مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K تیمار شدند و تاثیر این مهارکننده بر فعالیت متابولیک و همچنین القاء مرگ سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

کشت و تیمار سلولی

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) (انستیتو پاستور) در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. به‌علاوه، جهت اطمینان از صحت سلول‌های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RARα با استفاده از تکنیک RT-PCR برای این سل‌ل‌لین مورد بررسی قرار گرفت. پودر ۱۰ میلی‌گرم BKM120 به صورت لیوفیلیزه از شرکت Selleckchem (آمریکا) خریداری شد. به منظور تهیه استوک ۵۰ میکرومولار، مقادیر مورد نظر از پودر دارو در DMSO حل شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های مختلف BKM120 (۲-۲۵/۰ میکرومولار) و در زمان‌های ۲۴ و ۳۶ ساعت صورت گرفت. جهت جلوگیری از اثرات حلال روی میزان پرولیفراسیون و بقاء سل‌ل‌لین، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت تریپلیکیت انجام شد.

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay

برای ارزیابی تاثیر داروی BKM120 بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی (۲-۲۵/۰ میکرومولار) و فاقد دارو اضافه و به مدت زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه

شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر به سلول‌های داخل پلیت محلول MTT 5mg/ml (سیگما، آمریکا) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور ۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری

به منظور بررسی تاثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، ۱۰^۵ × ۵ سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف از داروی BKM120 (۲-۵/۰ میکرومولار) تیمار گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات-سالین (PBS) و افزودن معرف‌های AnnexinV-FITC (Roche Applied Science، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (PartecPasIII، آلمان) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار FloMax 2.3 صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از تیمار سلول‌ها با BKM120 با دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار و گذشت ۲۴ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و همچنین نمونه کنترل با استفاده از تریزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه NanodropND2000 بررسی شد. جهت انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA (TAKARA، ژاپن) استفاده شد. جهت سنتز cDNA مطابق با بروشور کیت نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷

درجه سانتی گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

بررسی کمی بیان ژنهای Bax و Bcl-2 دخیل در آپوپتوز برای بررسی کمی بیان ژنهای Bax و Bcl-2 آزمون RT-PCR انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرومولار SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرومولار cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هریک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۷ میکرومولار آب مقطر عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل

یک مرحله فعال سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی گراد) و مرحله اتصال / بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می باشد. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت؛ همچنین محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

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

ژن	Accession number	آغازگر معکوس (3'-5')	آغازگر مستقیم (5'-3')	سایز (bp)
HPRT	NM_000194	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT	TGGACAGGACTGAACGTCTT	۱۱۱
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bcl-2	NM_000633	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	۲۴۹

برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم افزار SPSS 21 و GraphPad Prism7 استفاده شد.

یافته ها

بررسی فسفریلاسیون Akt در سل لاین NB4 قبل و بعد از تیمار با BKM120

ابتدا به منظور مشخص کردن میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt، یکی از مهم ترین اجزاء مسیر انتقال پیام PI3K/Akt در سلول های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، سلول های NB4 پیش از تیمار با دارو و سپس پس از مواجه شدن با دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار از مهارکننده PI3K تحت آزمون وسترن بلات قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از بررسی وسترن بلاتینگ نشان می دهد که سلول های NB4 به علت سطح بالای فسفریلاسیون پروتئین Akt به خودی خود مسیر PI3K/Akt فعالی دارند (شکل ۱). همچنین ما دریافتیم که تیمار سلول های NB4 با دوزهای ذکر شده از مهارکننده PI3K به مدت ۱۲ ساعت، علیرغم آنکه تاثیری

وسترن بلات

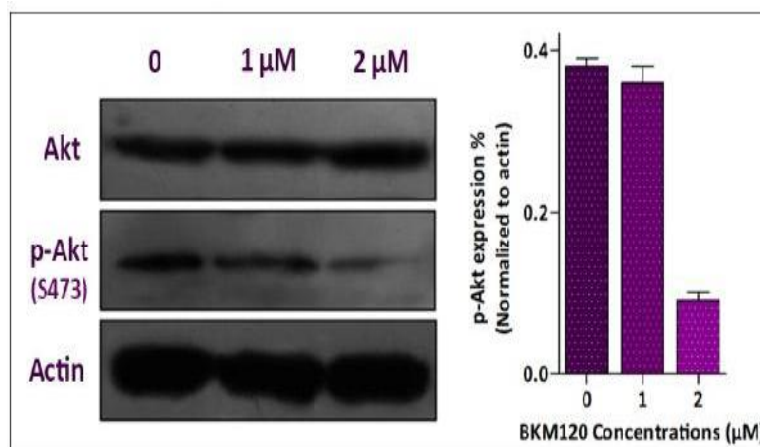
سلول ها ۱۲ ساعت پس از تیمار با مهارکننده با دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار سانتی فیوژ شدند و رسوب سلولی با PBS سرد شست و شو داده شد و در بافر RIPA که حاوی کوکتل مهارکنندگان پروتئاز و فسفاتاز می باشد (Sigma، آمریکا)؛ لیز شد. پس از تعیین غلظت پروتئین ها با روش Bradford میزان مشخصی از پروتئین تام درون سلولی در ژل SDS-PAGE ۱۰٪ قرار گرفتند و سپس به غشاء نیترو- سلولوزی با استفاده از semidry transfer cell (Bio-Rad) منتقل گشت. پروتئین ها با استفاده از آنتی بادی اولیه و ثانویه مورد ارزیابی قرار گرفت. شدت هر باند توسط نرم افزار ImageJ مورد محاسبه قرار گرفت و نسبت پروتئین ها به اکتین نرمالایز شدند.

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $\text{Mean} \pm \text{SD}$ قید شدند. هم چنین

کاهش نسبت p-Akt به Akt از پیشرفت این مسیر سیگنالینگ جلوگیری می‌کند (نمودار ۱).

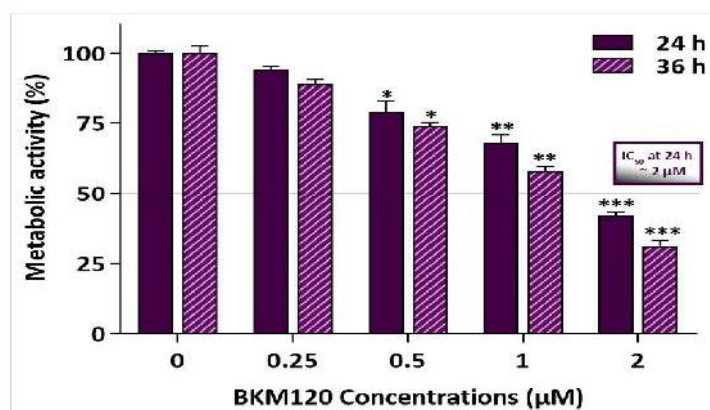
روی میزان بیان پروتئین Akt ندارد؛ اما به صورت وابسته به دوز میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt را کاهش می‌دهد و با



نمودار ۱. بررسی میزان فسفریلاسیون Akt در سلول‌های NB4. همانطور که در شکل مشخص است مسیر PI3K/Akt در رده سلولی NB4 به صورت غیرطبیعی فعال می‌باشد. همچنین نتایج موجود در این شکل نشان می‌دهد که با تیمار سلول‌های NB4 با BKM120 میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt به صورت وابسته به دوز کاهش پیدا می‌کند.

اعمال نماید. تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با دوزهای ۰/۵، ۰/۲۵ و ۱ میکرومولار از BKM120 میزان فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را به ترتیب ۶، ۲۱ و ۳۲٪ ($P < ۰/۰۵$) و ($p \leq 0.01$) کاهش می‌دهد (شکل ۲). همچنین، نکته قبل توجه در خصوص فعالیت سایتوتوکسیک این مهارکننده در این رده سلولی این است که تیمار سلول‌ها با دوز ۲ میکرومولار BKM120 فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را بیش از ۵۰٪ مهار نموده است. لازم به ذکر است که این اثر مهار با گذشت زمان بیش‌تر نیز می‌شود؛ به طوریکه پس از گذشت ۳۶ ساعت از تیمار سلول‌ها با بیش‌ترین دوز مهارکننده (۲ میکرومولار)، فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را ۶۹٪ ($P < ۰/۰۵$) کاهش می‌یابد (نمودار ۲).

کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 در حضور غلظت‌های مختلف BKM120
برای بررسی اینکه آیا مهار مسیر PI3K/Akt در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، می‌تواند منجر به کاهش فعالیت متابولیک و متعاقب آن کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها شود؛ سلول‌های NB4 با دوزهای افزایش‌دهنده داروی BKM120 تیمار شدند و سپس میزان فعالیت متابولیک آن‌ها توسط تست کالریمتري MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که BKM120 قادر است میزان فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد و به این ترتیب اثر سایتوتوکسیک خود را در این رده سلولی

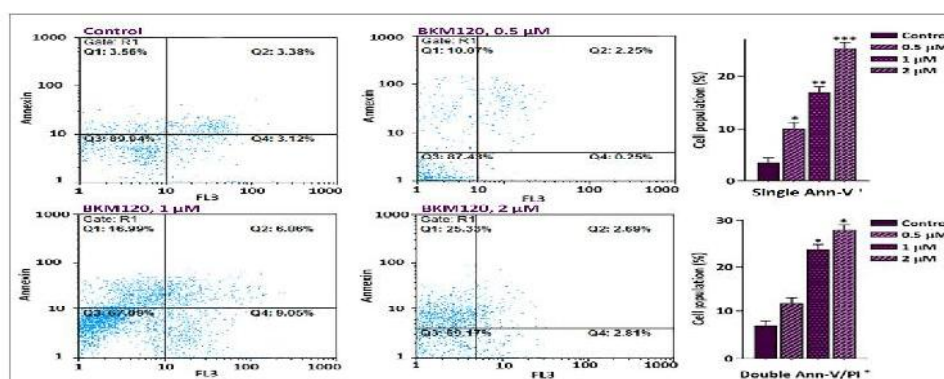


نمودار ۲. بررسی تاثیر داروی BKM120 بر فعاليت متابوليك رده سلولي NB4. پس از تيمار سلول‌ها با دوزهاي BKM120 به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت، اين دارو به صورت وابسته به دوز و زمان، ميزان فعاليت متابوليك سلول‌ها را به صورت معناداري کاهش داد. ميانگين و انحراف معيار نتايج حاصل از سه ران كاري مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بيانگر $p \leq 0.05$ ، **، بيانگر $p \leq 0.01$ و ***، بيانگر $p \leq 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتايج از نظر آماري در مقايسه با نمونه كنترل بود.

نتايج حاصل، از افزايش آپوپتوز القاء شده توسط غلظت‌هاي مختلف BKM120 حكايت دارد؛ به نحوي كه كم‌ترين و بيش‌ترين درصد آپوپتوز در سلول‌هاي تيمار شده با دارو به ترتيب مربوط به غلظت‌هاي ۰/۵ و ۲ ميكرومولار مي‌باشد. دوز ۰/۵ ميكرومولار BKM120 باعث القاء آپوپتوز ۱۵/۳٪ ($P < ۰/۰۵$) شده اين درحاليست كه غلظت ۲ ميكرومولار سلول‌هاي آپوپتوزي را تا ۶۶/۲۳٪ ($P < ۰/۰۰۱$) افزايش داده است (نمودار ۳).

داروي BKM120 منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌هاي NB4 مي‌شود

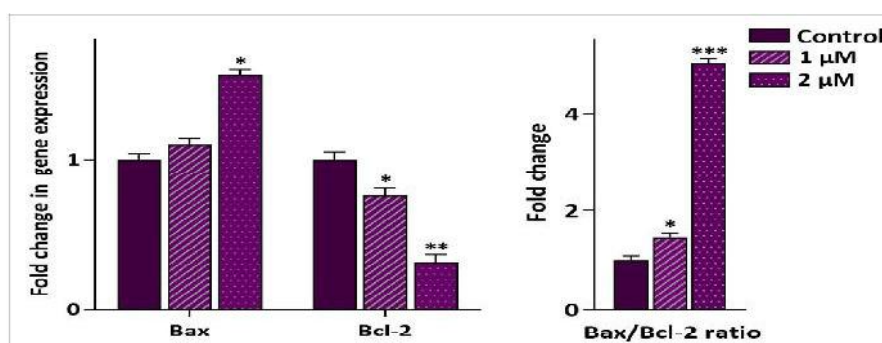
به منظور بررسي تاثير اينكه آيا اثر سايتوتوكسيك مهار كننده BKM120 در سلول‌هاي NB4 وابسته به فعال شدن مسيرهاي آپوپتوتيك مي‌باشد؛ سلول‌ها با غلظت‌هاي مختلف دارو (۰/۵-۲ ميكرومولار) به مدت ۲۴ ساعت انكوبه شدند و سپس ميزان خروج فسفاتيديل سرين در سطح سلول‌ها با روش فلوسايتومتري مورد ارزيابي قرار گرفت.



نمودار ۳. داروي BKM120 باعث القاء آپوپتوز در سلول‌هاي رده NB4 مي‌شود. پس از تيمار ۲۴ ساعته سلول‌هاي NB4 با دوزهاي افزاينده مهار كننده، ميزان جمعيت سلول‌هاي Annexin-V/PI مثبت به صورت وابسته به دوز افزايش يافت. ميانگين و انحراف معيار نتايج حاصل از سه ران كاري مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بيانگر $p \leq 0.05$ ، **، بيانگر $p \leq 0.01$ و ***، بيانگر $p \leq 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتايج از نظر آماري در مقايسه با نمونه كنترل بود.

به دست آمده حاکی از کاهش فعالیت رونویسی ژن Bcl-2 همراه با افزایش بیان mRNA ژن Bax به صورت وابسته به دوز در سلول‌های تیمار شده با BKM120 می‌باشد (نمودار ۴). نتایج به دست آمده حاکی از برهم خوردن موازنه بین ژن پرو و آنتی آپوپتوتیک می‌باشد؛ به طوریکه در تیمار با دوز ۲ میکرومولار نسبت بین Bax و Bcl-2 بیش از ۴ برابر افزایش داد ($P < 0.001$) که این امر نیز به نوبه خود از اثر سایتوتوکسیک این دارو در سلول‌های NB4 حکایت دارد (نمودار ۴).

افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان ژن Bcl-2 در سلول‌های NB4 تیمار شده با BKM120 بروز مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌ها تحت تاثیر فاکتورهای برون سلولی و درون سلولی مختلفی می‌باشد که در بین آن‌ها می‌توان Bcl-2 و Bax را به عنوان مهم‌ترین ژن‌های دخیل در القاء آپوپتوز معرفی نمود. به همین دلیل و به منظور بررسی اثر BKM120 بر در تغییر فعالیت رونویسی این ژن‌ها در سلول‌های NB4 میزان بیان mRNA ژن‌های Bax و Bcl-2 ۲۴ ساعت پس از تیمار با مهارکننده به صورت کمی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج



نمودار ۴. تاثیر BKM120 در تغییر فعالیت رونویسی ژن‌های Bax و Bcl-2 در سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 با غلظت‌های ۱ و ۲ میکرومولار از دارو به مدت ۲۴ ساعت تیمار و پس از ساخت cDNA میزان بیان ژن‌ها با استفاده از تکنیک RT-PCR محاسبه شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، پانگه $p \leq 0.05$ ، **، پانگه $p \leq 0.01$ ، ***، پانگه $p \leq 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث

طی دهه‌های اخیر مطالعات صورت گرفته روی مکانیسم‌های دخیل در تومورزایی، فعالیت غیرطبیعی مسیر PI3K/Akt را به دلیل نقش گسترده آن در تنظیم بسیاری از اعمال فیزیولوژیک داخل سلولی به عنوان یکی از شاخصه‌های اصلی سرطانی شدن سلول‌ها معرفی می‌نمایند (۱۷). فعالیت نابه‌هنگار این مسیر در بسیاری از بدخیمی‌های هماتولوژیک از جمله لوسمی پرومیئولوسیت حاد نیز گزارش شده است (۱۸) و نقش آن در ایجاد مقاومت نسبت به داروهای شیمی درمانی مورد استفاده در این بدخیمی نیز گزارش شده است

(۱۰). نتایج به دست آمده از بررسی تاثیر BKM120 روی سلول‌های NB4 برگرفته از APL نشان داد که این دارو احتمالاً با مهار مسیر PI3K/Akt و با جلوگیری از فسفریلاسیون پروتئین Akt که به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزاء این مسیر انتقال پیام شناخته می‌شود، اثرات سایتوتوکسیک خود را ایفا می‌کند و با مهار فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 و همچنین فعال نمودن مسیرهای آپوپتوتیک در این رده سلولی، میزان بقا و زنده‌مانی این سلول‌ها را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. همچنین ما دریافتیم که تیمار ۲۴ ساعته با دوز ۲

میکرومولار از این مهارکننده قادر است میزان بقاء سلول-های NB4 را بیش از ۵۰٪ کاهش دهد. لازم به ذکر است که مطالعات کارآزمایی بالینی در فاز I عنوان نموده‌اند که به منظور جلوگیری از بروز عوارض جانبی، دوز مجاز برای استفاده از داروی BKM120 در مطالعات پره‌کلینیکال و روی سل‌لاین‌های سرطانی ۴ میکرومولار می‌باشد (۱۸) و در این مطالعه نیز به خوبی نشان داده شد که اثر سایتوتوکسیک این مهارکننده در رنج قابل قبول قرار دارد و ما جهت بررسی تاثیر دارو در سل‌لاین NB4 دوز مصرفی را از محدوده مورد تایید بالاتر نبرده‌ایم. در همین راستا، نتایج حاصل از مطالعات گذشته نیز نشان داده است که BKM120 می‌تواند با مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt منجر به کاهش فعالیت متابولیک رده‌های سلولی مختلف نظیر T-ALL، B-CLL و DLBCL شود (۱۹-۲۱). همچنین در یک مطالعه دیگر، Monica Civallero و همکارانش نیز نشان دادند که داروی BKM120 در سلول‌های لنفوم از طریق شکستن کاسپاز ۳، ۸ و ۹ منجر به فعال شدن آپوپتوز از هر دو مسیر داخلی و خارجی می‌گردد (۲۲).

در بین مولکول‌های دخیل در آپوپتوز، پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که طیف وسیعی از داروهای شیمی‌درمانی با تاثیر گذاشتن بر میزان بیان دو ژن مهم از خانواده پروتئین-های آپوپتوتیک خانواده Bcl-2؛ یعنی Bax و Bcl-2 منجر به فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی در سلول‌های سرطانی می‌شوند. در واقع، افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax در کنار کاهش رونویسی از ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 می‌تواند با ایجاد شکست در آنزیم‌های اجرایی آپوپتوز همچون کاسپاز-۳ و PRAP منجر به القاء مرگ سلولی در بسیاری از سلول‌های سرطانی گردند (۲۳). جالب توجه است که نتایج به دست آمده از این بررسی نیز نشان داد که داروی BKM120 از طریق افزایش بیان ژن

پروآپوپتوتیک Bax، مهار رونویسی از ژن Bcl-2 و در نتیجه کاهش نسبت بین ژن پروآپوپتوتیک Bax به Bcl-2 منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4 گردد. بر همین اساس، یک تفسیر احتمالی از نتایج به دست آمده در این بررسی می‌تواند به این صورت باشد که احتمالاً داروی BKM120 از طریق تغییر میزان بیان دو ژن پرو و آنتی-آپوپتوتیک منجر به کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های رده NB4 گشته و در نهایت اثر سایتوتوکسیک خود را از طریق فعال نمودن مرگ سلولی با واسطه آپوپتوز در این رده سلولی اعمال نموده است. بررسی مطالعات پیشین نیز نشان می‌داد که سایر مهارکنندگان مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt نیز می‌توانند با ایجاد تغییر در میزان بیان ژن-های دخیل در پروسه آپوپتوز و برهمزدن تعادل بین پروتئین‌های پرو و آنتی‌آپوپتوزی منجر به القاء مرگ سلولی در رده‌های سلولی برگرفته از CLL و همچنین در سلول-های گرفته شده از بیماران مبتلا به این بدخیمی شود (۲۴).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که داروی BKM120 از طریق مهار فسفریلاسیون پروتئین Akt می‌تواند اثرات سایتوتوکسیک خود را روی سلول‌های NB4 اعمال نماید. همچنین، این دارو با القاء آپوپتوز در این رده سلولی می‌تواند به عنوان یک راهکار مناسب برای درمان لوسمی پرومیلوسیتیک حاد مطرح شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تامین بودجه تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016; 127:29-41.
2. Rogaia D, Grignani F, Nicoletti I, Pelicci P. The acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein reduces the frequency of commitment to apoptosis upon growth factor deprivation of GM-CSF-dependent myeloid cells. *Leukemia* 1995;9:1467-72.
3. Wu J, Wong WW-L, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res* 2004;64:6461-8.
4. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 2008;111:379-82.
5. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Biol Regul* 2006;46:249-79.
6. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005;24:7455-64.
7. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
8. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 88.
9. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Drug Discov* 2009; 8: 627-44.
10. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-62.
11. Pecchi S, Burger M, Nagel T, Schnell C, Menezes D, Knapp M, et al. Biological characterization of NVP-BKM120, a novel inhibitor of phosphoinositide 3-kinase in Phase I/II clinical trials. *Cancer Res* 2010;70:449-8.
12. Burger MT, Pecchi S, Wagman A, Ni Z-J, Knapp M, Hendrickson T, et al. Identification of NVP-BKM120 as a potent, selective, orally bioavailable class I PI3 kinase inhibitor for treating cancer. *ACS Med Chem Lett* 2011;2:774-9.
13. Koul D, Fu J, Shen R, LaFortune TA, Wang S, Tiao N, et al. Antitumor activity of NVP-BKM120—a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. *Clin Cancer Res* 2012;18:184-95.
14. Ren H, Chen M, Yue P, Tao H, Owonikoko TK, Ramalingam SS, et al. The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2012;325:139-46.
15. Jimeno A, editor. Molecular pathways in head and neck cancer: EGFR, PI3K, and more. American Society of Clinical Oncology; 2013.
16. Bendell JC, Rodon J, Burris HA, De Jonge M, Verweij J, Birl D, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012; 20;30:282-90
17. Chang F, Lee J, Navolanic P, Steelman L, Shelton J, Blalock W, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003;17:590-603.

18. Mahajan K, Mahajan NP. PI3K independent AKT activation in cancers: A treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol* 2012;227:3178-84.
19. Zang C, Eucker J, Liu H, Coordes A, Lenarz M, Possinger K, et al. Inhibition of pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase by NVP-BKM120 effectively blocks proliferation and induces cell death in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014;55:425-34.
20. Lonetti A, Antunes IL, Chiarini F, Orsini E, Buontempo F, Ricci F, et al. Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2014;28:1196-206.
21. Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M, et al. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2013;98:1739-47.
22. Civallero M, Cosenza M, Pozzi S, Bari A, Ferri P, Sacchi S. Activity of BKM120 and BEZ235 against Lymphoma Cells. *BioMed Res Int* 2015;2015: 1-12.
23. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
24. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:3603-12.