مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت تلومراز و میزان بیان ژن hTERT در سلول‌های سرطان سینه تحت تیمار پاپاورین

زهرا سادات نوری [۱]، ***سکینه کاظمی‌نورعینی*** [۲]، ***محمد نبیونی*** [۳]

[۱] کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

[۳] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دکتر سکینه کاظمی‌نورعینی
E-mail: kazemibio@gmail.com

وصول:۹۱/۴/۱۲ ، اصلاح:۹۱/۶/۲ ، پذیرش:۹۱/۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: حفظ تلومر که برای پایداری کروموزوم و نامیرایی سلول‌های سرطانی لازم است، بر عهده آنزیمی به نام تلومراز است. بنابراین مهار این آنزیم که در سلول‌های سوماتیک طبیعی در مقایسه با سلول‌های سرطانی فعالیت بسیار محدودی دارد، یک روش درمانی امیدوارکننده محسوب می‌شود. در یک بررسی اولیه غربالگری متابولیت‌های ثانوی گیاهی بر رشد سلول‌های سرطانی پاپاورین از دسته آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین اثرات مهاری قابل ملاحظه‌ای نشان داد و هدف این پژوهش بررسی اثر بر مسیر نامیرایی سلول‌های سرطانی در مدل کشت رده سرطانی MCF7 سینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: غلظت IC_{50} ترکیب خالص تجاری پاپاورین هیدروکلراید (سیگما) به روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) بعد از ۴۸ ساعت تیمار اندازه‌گیری شد. فعالیت نسبی تلومراز در سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده به روش real-time q-TRAP و بیان نسبی ژن جزء کاتالیتیک تلومراز hTERT با استفاده از Real time RT-PCR سنجش شد. اثر غلظت‌های بسیار کم دارو در کشت بلند مدت سلول‌ها با نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت تلومراز در غلظت IC_{50} پاپاورین که ۱۲۰ میکرومولار برآورد شد, کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند (تا حدود ۷۰ درصد نسبت به سلول‌های شاهد تیمار نشده) و این روند کاهشی، رفتاری وابسته به دوز دارد. کاهش تقریباً مشابهی که در سطح رونویسی ژن زیرواحد کاتالیتیک تلومراز در سلول‌های تحت تیمار پاپاورین مشاهده شد. تیمار بلند مدت سلول‌ها با غلظت‌های بسیار پایین این ماده، کاهش معناداری ($p<۰/۰۵$) در تعداد سیکل‌های سلولی در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: پاپاورین تأثیر ضدسرطانی قوی دارد که ناشی از مهار تلومراز می‌باشد. این ترکیب می‌تواند برای طراحی داروهای مؤثرتر ضدسرطان مورد توجه ویژه باشد.

واژه‌های کلیدی: *تلومراز، پاپاورین، آلکالوئید، سرطان.*

مقدمه

سلول‌های توموری در فرآیند سرطانی‌شدن دستخوش تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی می‌شوند که به آنها اجازه فرار از تنظیم طبیعی سیکل سلولی را می‌دهد. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها فعال شدن آنزیم تلومراز است. در واقع نگهداری طول تلومر در بیش از ۸۵ درصد سلول‌های سرطانی به سبب فعالیت آنزیم تلومراز (telomerase) است (۱).

آنزیم تلومراز انسانی یک ریبونوکلئوپروتئین است که شامل دو بخش پروتئینی و RNA ساخته شده است. از مجموعه پروتئینی آنزیم، زیرواحد نسخه‌بردار معکوس تلومراز (hTERT) نقش آنزیمی را دارد, در حالی‌که زیرواحد RNAیی آن (hTR) به‌عنوان الگو در سنتز تکرارهای هگزامری تلومر عمل می‌کند (۲). سلول‌های سرطانی برای ادامه روند تکثیر به سطح بالایی از آنزیم تلومراز نیازمندند و با این وجود درازای تلومر در این سلول‌ها کوتاه‌تر از سلول طبیعی سوماتیک است (۳). از آن‌جا که سلول‌های طبیعی و بافت توموری در بیان تلومراز، درازای تلومر و سینتیک سلولی تفاوت دارند و سطح این آنزیم در سلول‌های طبیعی بسیار پایین است، استفاده از عامل‌های مهارکننده تلومراز نمی‌تواند اثر چشمگیری بر سلول طبیعی داشته باشد (٤,٥).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اندازه‌گیری فعالیت تلومراز در تشخیص مراحل اولیه سرطان که قابل ردیابی با روش‌های دیگر نمی‌باشد، مؤثر است و به عبارت دیگر تلومراز می‌تواند علاوه بر این که هدف دارویی مناسبی است، یک نشانگر اولیه و مستقل در تشخیص سرطان نیز محسوب گردد (۵). مهار تلومراز در سلول‌های سرطانی منجر به کوتاه شدن تلومرها و مهم‌تر از آن عدم پایداری تلومرها و ایجاد اختلال در تکثیر سلولی می‌شود و می‌تواند یک روش مناسب در شیمی‌درمانی سرطان باشد (٦).

در مطالعات غربالگری پیشین ما، پاپاورین اثر مهارکنندگی قوی بر رشد سلول‌های سرطانی نشان داده بود و در پی یافتن یکی از محتمل‌ترین مکانیسم‌های ضد نامیرایی در این پژوهش به بررسی اثرات آن بر فعالیت تلومراز و بیان ژن آن در روند رشد سلول‌های MCF-7 به عنوان مدلی از سلول‌های سرطان سینه پرداخته‌ایم. پاپاورین یک آلکالوئید سمی است که اثرات زیستی متنوعی داشته (۷) و از جمله متعلق به گروهی از داروها به نام منبسط کننده عروق می‌باشد (۸).

پاپاورین و نوسکاپین از آلکالوئیدهای خشخاش می‌باشند که در گروه آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین قرار می‌گیرند و ساختاری بسیار متفاوت از گروه آلکالوئیدهای مورفینی شامل مورفین، کدئین و تبائین دارد (۹). مطالعات اخیر نشان داده است که نوسکاپین باعث تحریک مسیر آپوپتوز در بسیاری از انواع سلول‌ها می‌شود و فعالیت ضد توموری قوی علیه تومورهای لنفاوی جامد جوندگان و تومورهای مثانه و سینه انسانی کاشته شده در موش دارد، درحالی‌که در مقایسه با دیگر داروهای مهارکننده پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها، سمیت کمتر و دامنه اثر گسترده‌تری در مدل‌های حیوانی داراست (۱۰).

گزارش‌های پراکنده‌ای از تأثیرات مهاری برخی آلکالوئیدها بر فعالیت تلومرازی در دست است. یکی از مشتقات الیپتیسین به نام HE-۹ یک آلکالوئید ضد سرطان است که با مهار فعالیت تلومراز عمل می‌کند (۱۱). بربرین نیز آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی HL-60 القا کرده و طی آن فعالیت تلومراز کاهش می‌یابد (۱۲). سورامین نیز تأثیر مهاری بر تلومراز را نشان داده است (۱۳). به تازگی نیز سری جدید مشتقات کوئینولین طراحی و ساخته شده است که به گسترش مهارکننده‌های قوی و جدید تلومراز کمک می‌کند (١٤).

در مورد مکانیسم عمل آلکالوئیدها به واسطه مهار تلومراز نکات قابل توجهی وجود دارد. مولکول DNA اغلب به‌عنوان یک مولکول دو رشته‌ای مورد توجه است که در آن، بازها با تشکیل جفت‌های واتسون– کریکی در

کنار هم نگه داشته شده‌اند. با این حال توالی‌های ویژه‌ای از DNA که غنی از گوانین (G) هستند، می‌توانند ساختار چهار رشته‌ای تشکیل دهند. این توالی‌ها در انتهای کروموزوم‌ها (ناحیه تلومری) و همچنین در نواحی تنظیمی رونویسی در چندین انکوژن مهم به فراوانی دیده می‌شوند. این الگوی تاخوردگی ویژه در تک رشته غنی از G در ناحیه تلومری می‌تواند فعالیت آنزیم تلومراز برای افزودن تکرارهای تلومری به آن را مهار کند. بدیهی است که مولکول‌هایی که چنین ساختارهای چهار رشته‌ای G را القا و تثبیت کنند، می‌توانند برای مهار تلومراز مؤثر باشد.

ترکیباتی که با ساختار چهارجزئی G واکنش می‌دهند، به‌طور مستقیم تلومراز را هدف قرار نمی‌دهند، بلکه سوبسترای آن یعنی تلومر مورد هدف است (٦). کریپتولپین یکی از آلکالوئیدهای طبیعی کوئینودولین می‌باشد که در بررسی‌های اخیر بعضی از مشتقات ساختاری آن توانایی واکنش با ساختاری چهار رشته‌ای DNAیی و مهار فعالیت تلومراز را نشان داده‌اند (١٥). این احتمال وجود دارد که پاپاورین نیز بتواند با چنین مکانیسمی‌بر فعالیت تلومراز مؤثر باشد.

با توجه به شواهد موجود احتمال می‌رود پاپاورین بتواند کاندیدای مناسبی در مهار تلومراز باشد و هدف این پژوهش بررسی این فرضیه در شرایط آزمایشگاهی بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 می‌باشد. فعالیت تلومراز با استفاده از سنجش TRAP بررسی شده و بیان ژن زیر واحد کاتالیتیک تلومراز با استفاده از Real-time RT-PCR سنجش شد. به علاوه از آنجا که شواهد موجود نشان دهنده کاهش رشد سلول‌های سرطانی طی تیمار با داروهای مهارکننده تلومراز می‌باشد، در این مطالعه از کشت بلندمدت سلول‌های سرطانی تیمار شده با پاپاورین، جهت بررسی ارتباط بین اثر پاپاورین و روند تکثیر سلولی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های MCF7 در فلاسک‌های cm^2 ٧٥ در محیط DMEM High Glucose with Glutamin (شرکت PAA، اتریش) حاوی ١٠ درصد سرم Fetal Bovin FBS(Serum gold) (شرکت PAA، اتریش) و پنی سیلین/ استرپتومایسین (شرکت PAA، اتریش) نگهداری شدند و در CO2 انکوباتور (Astec, Japan) با شرایط دمایی ٣٧°C و CO_2 ٥ درصد و رطوبت ١٠٠ درصد رشد یافتند. محیط کشت، هر ٤٨ ساعت یک بار، تعویض می‌شد و سلول‌ها هر ٦-٥ روز با استفاده از تریپسین-EDTA ساب کالچر می‌شدند (١٦).

تست سمیت

سلول‌های MCF7 در حال رشد در پلیت‌های ٩٦ خانه به تعداد 10^4 سلول در هر خانه کشت شدند و بعد از ٢٤ ساعت با محیط حاوی غلظت‌های مختلف پاپاورین تیمار شدند. بعد از ٤٨ ساعت سلول‌ها با PBS شسته و در محیط تازه، شامل MTT ٠/٥ mg/ml در دمای ٣٧°C انکوبه شدند. سپس محیط کشت و MTT از تمام خانه‌ها تخلیه و کریستال‌های فورمازال تشکیل شده در ١٠٠µl حلال آن (١٠ g SDS در ١٠٠ ml DMSO و ١ ml اسید استیک گلاسیال) حل شد. جذب هر چاهک به کمک دستگاه پلیت ریدر (BioTek, USA) و با استفاده از نرم-افزار Gen5 1.06 در طول موج ٥٧٠ nm اندازه‌گیری و مقادیر جذب به‌صورت درصدی از کنترل‌های تیمار نشده بیان و غلظت مهاری IC_{50} با استفاده از نمودارهای به-دست آمده از حداقل ٤ آزمایش مستقل با حداقل ٣ بار تکرار محاسبه گردید (١٧).

سنجش فعالیت تلومراز به روش Quantitative real-time TRAP assay

سلول‌های MCF7 در پلیت‌های ١٢ خانه کشت و به مدت ٤٨ ساعت با غلظت‌های مختلف پاپاورین تیمار شدند. سپس تریپسینه و با PBS سرد شستشو و در بافر لیز حاوی تریس-کلراید ١٠ میلی‌مولار pH=7.5، یک میلی-مولار منیزیم کلرید، یک میلی‌مولار EGTA و ٠/١ میلی‌مولار

فنیل متیل سولفونیل فلورید، ۵ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانل، CHAPS ۰/۵ درصد و ۱۰ درصد گلیسرول هموژنیزه گردیده و به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه و در rpm ۱٤۰۰۰ برای ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند (۱۸). غلظت پروتئین استخراج شده بر اساس سنجش برادفورد اندازه-گیری شده (۱۹). مقداری معادل ۰/۵ میکروگرم محصول استخراج تلومراز از هر یک از نمونه‌های سلول‌های MCF7 تیمار شده و کنترل برای اندازه‌گیری فعالیت تلومراز به روش Quantitative real-time TRAP assay استفاده شد (۲۰). مخلوط واکنشی به کار رفته که به عصاره آنزیمی‌امکان فعالیت می‌دهد، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت real-time PCR Rotar geen sybr green kit 2x، ۰/۵ میکروگرم پرایمر TS (5´- AATCCGTCGAGCAGATT-3´) و ۹ µl H_2O- DEPC بود. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۰/۵ میکروگرم پرایمر ACX (5'- (CCCTTA)4-3') به مخلوط واکنشی اضافه شد تا محصول فعالیت آنزیمی‌تلومراز طی برنامه PCR در ماشین real-time thermal cycler (Corbet, QIAGEN) تکثیر شود. در این تست دو کنترل استفاده شد: یک کنترل مثبت با استفاده از عصاره سلولی حاوی ۰/۵ µg پروتئین از سلول‌های MCF7 غیر تیمار و یک کنترل منفی که یک مخلوط واکنشی فاقد عصاره سلولی بود. همچنین چند استاندارد با مخلوط واکنشی شامل عصاره تلومراز غیرتیمار رقیق شده (1/5 , 1/25 , 1/125) تهیه شد که همانند نمونه‌ها تمام شرایط و مراحل آزمایش را طی کرد تا برای آنالیز داده‌ها استفاده شود. فعالیت تلومراز برای هر غلظت پاپاورین در سه آزمایش مستقل و هر یک حداقل با سه بار تکرار اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA، رونویسی معکوس و Real-time RT-PCR

از سلول‌های MCF7 کشت داده شده در فلاسک $v_{5}cm^2$ با غلظت‌های مختلف پاپاورین پس از ٤۸ ساعت انکوباسیون، RNA تام با استفاده از کیت RNeasy Plus Mini (Qiagene,USA) استخراج و به فریزر ^{o}c ۸۰- منتقل گردید. کیفیت RNAهای استخراج شده به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد و غلظت آن‌ها با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Nanodrop 1000) سنجیده شد. سنتز cDNA توسط کیت (USA, Bioneer) Accupower RT premix در حجم 20µl انجام شد (۲۱).

با استفاده از Real-time RT –PCR میزان بیان ژن‌ها سنجیده شد و از ژن β2– میکروگلوبولین به‌عنوان ژن خانه‌نگهدار استفاده گردید. برای این منظور از کیت Top taq master mix(Qiageen) و طبق پروتکل مربوطه استفاده شد. واکنش درحجم ۲۰ µl انجام شد که شامل cDNA 2µl، ۱۰µl از کیت 2x Top taq master SYBR green و ۰/۵ µl از هر جفت پرایمر ژن مربوطه بود. توالی پرایمرها به‌صورت زیر است:

Forward:ACGGCGACATGGAGAACAA و Reverse: CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC برای hTERT (7tert) و Forward: 5'-CTC CGT GGC CTT AGC TGT G-3' Reverse: 5'-TTT GGA GTA CGC TGG ATA GCC T-3' برای بتامیکروگلوبولین. یک مخلوط واکنشی فاقد cDNA به‌عنوان کنترل منفی تهیه شد و به همراه سایر نمونه‌ها، تمام شرایط و مراحل آزمایش را طی نمود. برای محاسبه و آنالیز داده‌ها از منحنی استاندارد به‌دست آمده از دستگاه تحت نرم‌افزار RotorGene6 استفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده در منحنی استاندارد شامل cDNA ی اصلی و سه رقت سریالی (۱/۲، ۱/٤، ۱/۸) برای 7tert و (۱/۵، ۱/۲۵، ۱/۱۲۵) برای β2mg بود که همانند نمونه‌ها تمام شرایط و مراحل آزمایش را طی نمود. این آزمایش برای هر ژن دوبار و هر بار با حداقل دو تکرار انجام شد (۲۲).

کشت بلند مدت

برای کشت بلند مدت سلول‌های MCF7 تیمار شده با پاپاورین و غیرتیمار در پلیت‌های ٦ خانه و در هر

خانه 10^5 سلول کشت شدند. بعد از ۵-٤ روز هنگامی‌که ۸۰-۷۰ درصد سطح فلاسک پر شد، سلول‌ها تریپسینه و با استفاده از یک هموسایتومتر و رنگ‌آمیزی با تریپان آبی ۰/۱ درصد شمارش شدند . هر بار 10^5 سلول به هر خانه در پلیت جدید انتقال یافت. در هر پاساژ، هر خانه برای ٤۸ ساعت با غلظت مورد نظر از پاپاورین تیمار شد و بعد از آن دارو تخلیه و محیط بدون دارو به سلول‌ها داده شد.

FRET

توالی سنتتیک F21T مشابه توالیهای تلومری انسان به‌وسیله شرکت Eurofin آلمان سنتز شد. پس از ۱۰ دقیقه جوشاندن در ۹۵ درجه سانتیگراد و قرار دادن در حضور غلظت‌های مختلف پاپاورین از صفر تا ۱۲۰ میکرومولار در محیط حاوی بافر کاکودیلات ۱۰ میلی-مولار- پتاسیم کلراید ۱۰۰ میلی‌مولار به‌مدت ۲ ساعت میزان فلورسانس به‌وسیله دستگاه Real-time thermal cycler کانال SYBR Green و برنامه ذوب حرارتی از دمای ۲۷ تا ۹۵ درجه با گرادیان یک درجه در دقیقه قرائت شد و منحنی دیفرانسیل شدت فلورسانس علیه دما برای محاسبه دمای گذار (دمای ذوب) استفاده شد (۲۳). سنجش‌ها با سه تکرار برای هر غلظت انجام شد و میانگین مقادیر مورد قضاوت قرار گرفت.

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست آمده از تکرارهای منطقی هریک از روش‌ها با استفاده از آزمون t با در نظر گرفتن $p\leq۰/۰۵$ به‌عنوان اختلاف معنادار بین گروه‌های شاهد و نمونه‌ها آنالیز شدند.

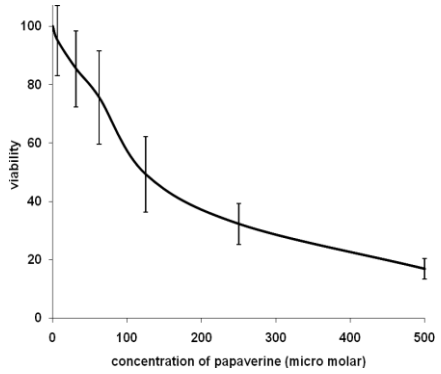
یافته‌ها

اثر پاپاورین بر بقای زیستی سلول‌های MCF7 که با روش MTT بعد از ٤۸ ساعت تیمار سنجش شد، در تصویر ۱ دیده می‌شود. منحنی درصد سلول‌های زنده تحت تیمار را در مقایسه با سلول‌های شاهد نشان می‌دهد و به‌طور کلی منحنی حاکی از آن است که با افزایش غلظت دارو قابلیت زیستی سلول‌های MCF7 کاهش می‌یابد. با توجه به میانگین محاسبه شده از حداقل چهار تکرار مستقل آزمایش، که هریک شامل حداقل سه نمونه برای هر غلظت بوده است، می‌توان گفت که غلظت ۵۰ درصد کشنده (IC50) پاپاورین در سلول‌های MCF7 حدود ۱۲۰ µM است.

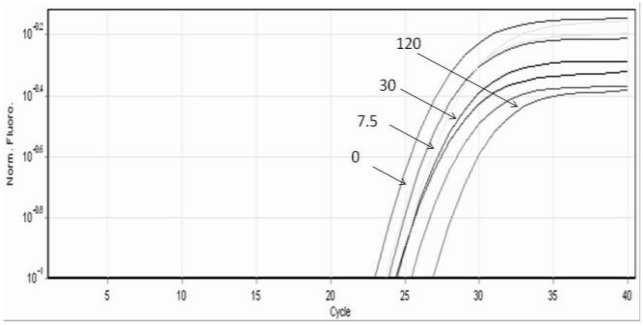
نتایج به‌دست آمده از تکثیر محصول فعالیت تلومراز در عصاره‌های استخراج شده از سلول‌های کنترل و تیمار با پاپاورین به روش Quantitative real-time TRAP assay و با استفاده از نرم‌افزار RotorGene 6 حاکی از آن است که با افزایش غلظت پاپاورین مقدار CT (سیکلی که در آن میزان فلورسانس از نظر آماری مهم شده و در فاز لگاریتمی‌قرار می‌گیرد، به گونه‌ای که مقایسه بین نمونه‌ها در بهترین وضعیت است) افزایش یافته و به عبارت دیگر تعداد کپی تکرارهای تلومری محصول تلومراز کمتر می‌شود (تصویر ۲).

میزان محصول سنتز شده توسط تلومراز باتوجه به نمودارهای منحنی استاندارد حاصل از آنالیز دستگاه محاسبه شده و منحنی درصد فعالیت تلومراز برحسب غلظت پاپاورین در مقایسه به کنترل تیمار نشده رسم شد (شکل ۳). آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون t در نظر گرفتن $p\leq۰/۰۵$ به‌عنوان معیار, نشان می‌دهد که بین فعالیت تلومراز در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف پاپاورین نسبت به نمونه‌های کنترل با اختلاف معناداری وجود دارد. به‌طوری‌که در غلظت ۱۲۰ میکرومولار فعالیت آنزیم در حدود ۷۰ درصد، در مقایسه با کنترل تیمار نشده کاهش می‌یابد.

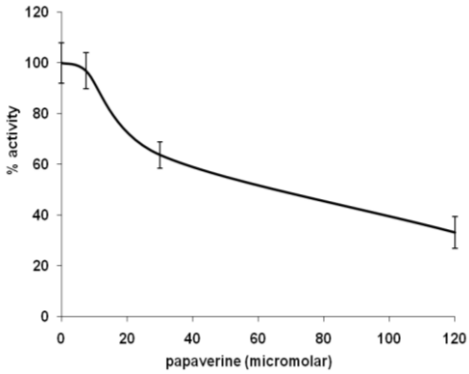
برای هریک از نمونه‌ها سنجش نسبی کپی‌های hTERT و ژن β2mg به عنوان یک کنترل درونی به روش Real-Time RT-PCR انجام شد. برای بررسی و تحلیل سطح بیان ژن hTERT نیاز است که بیان این دو ژن نسبت به هم و در مقایسه با مقادیر مرتبط در سلول‌های کنترل تیمار نشده، سنجیده شود. کسر کپی‌های تکثیر شده



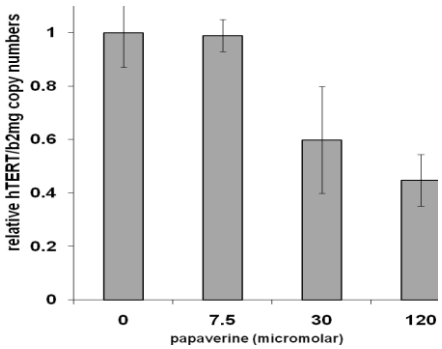
تصویر۱: نمودار سنجش میزان بقای زیستی سلول‌های MCF7 تحت تیمار پاپاورین به روش MTT



تصویر۲ : نمودار شدت فلورسانس بر حسب سیکل‌های PCR. منحنی‌ها ازچپ به راست به ترتیب مربوط به عصاره پروتئین استخراج شده ازسلول‌های کنترل مثبت (غلظت صفر دارو) و سلول‌های تیمارشده با غلظت‌های ۷/۵، ۳۰ و ۱۲۰ میکرومولار پاپاورین می‌باشد.



تصویر ۳: منحنی در صد فعالیت تلومراز بر حسب غلظت پاپاورین

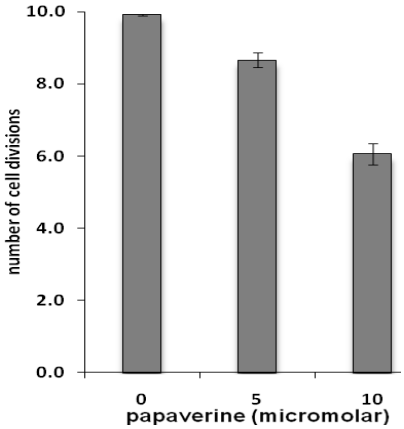


تصویر۴ : بیان ژن hTERT نسبت به بیان ژن B2mg در سلول‌های MCF7 تیمار شده با پاپاورین در غلظت‌های ۳۰،۷/۵ و ۱۲۰ µM و کنترل تیمار نشده. پراکندگی داده‌ها و میانگین آنها در شکل نشان داده شده است.

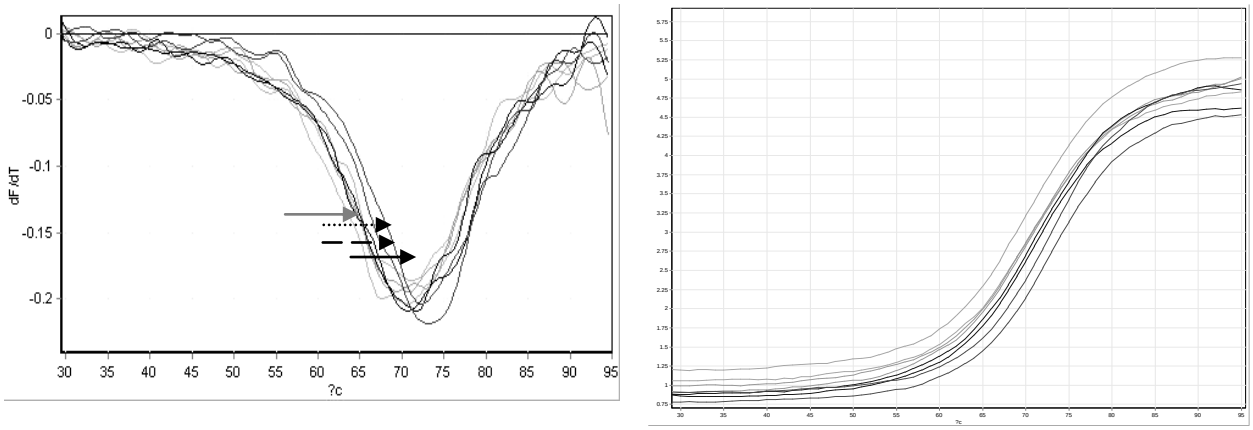
hTERT نسبت به بتامیکروگلوبولین، با استفاده از نمونه‌های استاندارد هریک محاسبه شد و سپس میزان بیان نسبی ژن hTERT در غلظت‌های مختلف دارو در مقایسه با کنترل تیمار نشده به دست آمد. نمودار حاصل در تصویر ٤ آمده است.

الگوی کاهش روند رونویسی ژن hTERT به‌طورکلی مشابه منحنی کاهش فعالیت تلومراز است، ولی در غلظت ۱۲۰ میکرومولار این کاهش در حدود ۵۰ درصد می‌باشد. با درنظر گرفتن اینکه این آنالیز با استفاده از میزان رونویسی بتا-میکروگلوبین استاندارد شده است، کاهش کپی‌های رونوشت hTERT قابل ملاحظه و به لحاظ آماری معنی‌دار است. می‌توان نتیجه گرفت با افزایش غلظت دارو سطح بیان نسبی hTERT کاهش یافته است. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون t نشان می‌دهد که بین بیان ژن hTERT در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف پاپاورین نسبت به نمونه‌های کنترل در ارتباط با $p=0.05$ اختلاف معناداری وجود دارد.

تیمار طولانی مدت سلول‌های MCF7 با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار پاپاورین برای ٤٨ ساعت در هر پاساژ مهار رشد مؤثری را نشان داد. تصویر ۵، میانگین تعداد دو برابر شدن جمعیت سلولی را در ارتباط با این دو غلظت از پاپاورین را نشان می‌دهد. در اینجا کاهش سرعت رشد سلول‌هایی که برای ٦ بار با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار پاپاورین تیمار شده‌اند نسبت به سلول‌های کنترل تیمار نشده قابل مشاهده است. تیمارهای مذکور به ترتیب باعث کاهش حدود ۱۰ و ٤٠ درصد آهنگ تقسیمات سلولی می‌شود.



تصویر ۵: تعداد دو برابر شدن جمعیت سلولی بعد از تیمار طولانی مدت با غلظت‌های پایین پاپاورین



شکل ۶: منحنی تغییرات شدت فلورسانس علیه دما (بالا) و دیفرانسیل زمانی تغییرات شدت فلورسانس علیه دما (پایین) برای اولیگونوکلئوتید سنتتیک چهار رشته‌ای تلومر انسانی در حضور غلظتهای مختلف پاپاورین هیدروکلرید (خاکستری– صفر، نقطه چین ۶/۵، خط چین ۶۵ و ممتد ۱۲۰ میکرومولار).

بحث

تاکنون چندین ترکیب طبیعی قوی یا مشتقات آنها، عمدتاً متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌عنوان عوامل ضد سرطان گزارش شده‌اند (۲٤). گیاهان خانواده شقایق (پاپاوراسه) شامل Opium poppy ,Caliornia poppy به لحاظ دارا بودن داروهای تخدیری و ترکیبات مرتبط، دارای اهمیت تجاری خاصی هستند. خصوصیات دارویی این گیاه مربوط به قابلیت تولید و بیوسنتز گروهی از آلکالوئیدهای بنزوفنانتریدین از زیرگروه آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی می‌باشد. آلکالوئیدهای بنزوایزوکوئینی گروه متنوعی از ترکیبات ازت‌دار هستند که پراکنش تاکسونومی محدودی در بین گیاهان داشته و بسیاری از آنها خواص دارویی مهمی‌دارند، از جمله می‌توان به مسکن‌هایی نظیر مرفین و کدئین، آنتی بیوتیک‌هایی مانند سنگواینارین دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد التهابی، نوسکاپین‌ها با خاصیت ضد سرفه و ضد توموری، پاپاورین به‌عنوان گشادکننده‌ی رگ‌ها، توبوکورارین با خاصیت شل کننده عضلات اشاره نمود (۹).

پاپاورین با بربرین و نوسکاپین که دارای خواص ضد توموری هستند، شباهت ساختاری دارد و بر اساس مطالعات اخیر احتمالاً می‌تواند به عنوان یک عامل شیمیایی بازدارنده علیه سرطان زاهای شیمیایی عمل کند (۲۵). در مکانیسم‌های مهار تلومراز چندین احتمال وجود دارد: توالی‌های DNA تلومر انسانی شامل نوکلئوتیدهای G پشت سر هم می‌باشد که می‌توانند به‌صورت یک ساختار چهار رشته‌ای به نام G-quadruplex تا بخورند که خود در فرآیندهای مهم زیستی درگیر می‌باشند. لیگاندهای انتخابی و پایدارکننده ساختار چهار جزئی G بالقوه توانایی مهار فعالیت تلومراز و یا تغییر سطوح بیان انکوژن‌ها را دارند و بنابراین ممکن است به عنوان عوامل

ضد سرطان عمل کند (۲۶).

از سوی دیگر به دلیل کوتاه‌تر بودن تلومرها در سلول‌های سرطانی و نیز بیان بسیار بیشتر تلومراز در بافت‌های سرطانی در مقایسه با بافت‌های طبیعی می‌توان انتظار داشت که داروهایی که عمل تلومراز را مهار می‌کنند، به‌طور ویژه باعث مرگ سلول‌های سرطانی شوند. چنان‌که اگر میانکنش پروتئین‌های تلومری با توالی‌های مربوطه از بین برود با القای آپوپتوز به مرگ سریع سلول‌های سرطانی می‌انجامد (۲۷). ترکیباتی که ساختار DNA چهار رشته‌ای را تثبیت می‌کنند احتمالاً این میانکنش‌ها را مختل نموده و در آزمایشات نیز نشان داده شده است که فعالیت تلومراز را مهار می‌کنند (۲۸). بربرین, سنگوایناربن و کورالین چنین رفتاری را دارند (۳۱-۲۹). این احتمال به‌طور جداگانه و با استفاده از روش‌های بیوشیمی-فیزیکی برای روشن نمودن میزان برهمکنش‌های دارو و ساختارهای سوبسترای آنزیم تلومراز مورد بررسی قرار می گیرد که در اینجا از آزمون سنجش دمای ذوب سوبسترای سنتتیک تلومراز (F21T) در حضور پاپاورین با استفاده از روش FRET استفاده شد. بر اساس مطالعات ما پاپاورین باعث افزایش مختصری در حدود ٤ تا ٥ درجه سانتیگراد در دمای ذوب توالیهای تلومری می‌شود (شکل ٦). اگرچه این مقدار افزایش دما چندان قابل ملاحظه نیست، احتمالاً پاپاورین با مختصری پایدارتر کردن ساختار چهار رشته‌ای سوبسترای آنزیم می‌تواند به‌طور جزئی در مهار آن نقش داشته باشد. این فرآیند در درون سلول باعث عدم دسترسی آنزیم به سوبسترای طبیعی خود می‌شود که به کاهش فعالیت آنزیم و به راه افتادن مسیرهای مختلف از جمله آپوپتوزیس, توقف سیکل سلولی و پیری می‌انجامد (۳۲,۳۳). به این ترتیب انتظار می‌رود در عمل مانع فعالیت تلومراز در درون سلول گردد، همچنان‌که در تیمار بلندمدت سلول‌ها باعث کاهش شدید تعداد تقسیمات سلولی آن شده است (شکل ٥). در تأیید این مطلب بر اساس مطالعات دیگران (۳٤) داده‌هایی دال بر میانکنش برخی مشتقات پاپاورین با ساختارهای DNA چهار رشته‌ای وجود دارد که خود نشان دهنده نزدیک بودن ساختار پاپاورین به مولکولی است که بتواند با کارایی بالا در مهار تلومراز مورد استفاده قرار گیرد و خود نویددهنده ظهور مولکول‌های مؤثرتر برای سرکوب فعالیت تلومراز و توقف رشد سلول سرطانی می‌باشد.

مکانیسم‌های احتمالی دیگر شامل کاهش مقدار آنزیم فعال در سلول می باشد که سنجش فعالیت آنزیم را مطرح می‌سازد. نتایج آزمایشات ما نشان داد که در سلول‌های MCF7 بعد از تیمار با پاپاورین، فعالیت تلومراز به‌طور قابل توجهی به‌صورت وابسته به دوز کاهش می یابد. کاهش در فعالیت تلومراز ناشی از کاهش تعداد سلول‌ها به عنوان درصد سلول‌های زنده نیست چرا که سنجش‌ها در مقادیر مساوی پروتئین از هر نمونه انجام شده است، و با این وجود در غلظت IC_{50} که ٥٠ درصد سلول‌ها بر اثر تیمار زنده مانده‌اند، کاهش فعالیت تلومراز بسیار بیشتر از آن و در حدود ۷۰ درصد است.

از آنجا که تنظیم تلومراز اساساً در سطح رونویسی است (۳٥,۳٦) سنجش میزان رونویسی در سلول‌های تحت تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده مورد توجه قرار گرفت. با افزایش غلظت پاپاورین در سلول‌های تحت تیمار کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار mRNA ژن hTERT دیده می‌شود که الگوی مشابهی با روند کاهش فعالیت آنزیم دارد (شکل ٤). به‌طورکلی تفاوت معناداری بین فعالیت تلومراز و نیز بیان ژن hTERT در سلول‌های تیمار شده با پاپاورین در مقایسه با سلول‌های کنترل تیمار نشده مشاهده شد.

نتایج این سه سطح مشاهدات یعنی سنجش فعالیت آنزیم استخراج شده از سلول‌های تیمار شده, سنجش میزان رونویسی از ژن و سنجش پایداری ساختار تاخورده در سوبسترای آنزیم در حضور پاپاورین یکدیگر را تأیید نموده و پیشنهاد می‌شود که پاپاورین با کاهش

دادن میزان تلومراز فعال در سلول باعث سرکوب نامیرایی سلول می‌شود. در اثر همین کاهش فعالیت تلومراز توانایی تکثیر سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بسیار پایین نیز پس از حدود چهار هفته به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان داده است. در این سلول‌ها سرعت تکثیر کاهش یافته و به همین ترتیب زمان دو برابر شدن سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده بسیار طولانی‌تر است.

نتایج این پژوهش برای اولین بار اثرات ضد تلومرازی پاپاورین در سلول‌های سرطانی را گزارش می‌کند و آن را به‌عنوان یک ترکیب طبیعی مناسب برای طراحی ترکیبات مؤثرتر پیشنهاد می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه حکیم سبزواری که محل انجام این پژوهش بوده است، تشکر می‌شود. این پژوهش شامل قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد زهرا سادات نوری دانشجوی رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات می‌باشد و بخشی از هزینه‌های آن از محل طرح شماره ۱۵۶۷٤/د تحت حمایت دانشگاه حکیم سبزواری پوشش داده شده است.

References

1. Li H, Liu JP. Signaling on telomerase: a master switch in cell aging and immortalization. Biogerontology. 2002; 3(1-2):107-16.
2. Kim JH, Kim JH, Lee GE, Kim SW, Chung K. Identification of a quinoxaline derivatives that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular Senescence of human cancer cells . Biochem J. 2003; 373(PT 2): 523 –9.
3. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. Br J Cancer. 2007; 96(7): 1020-4.
4. Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. Br J Pharmacol .2007; 152(7): 1003-11.
5. Hanahan D. Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100(1): 57–70.
6. Zhou J, Zhu XF, Lu YJ, Deny R, Huang ZS , Mei YP,Wang Y, Huaang WL, Liu ZC, Gu LQ, Zeng YX. Senescence and telomere shortening induced by novel potent G. quadruplex interactive quindoline derivatives in human cancer cell lines. Oncogene . 2006, 25(4): 503 –11.
7. Efferth T, Wink M. Chemical-Biology of Natural Products from Medicinal Plants for Cancer Therapy. Alternative and Complementary Therapies for Cancer. 2010; 9 : 557-582
8. Prabhakara P, Koland M, K V, NM H, G Sh, Ahmed MG, R NCh, D S. Preparation and evalution of transdermal patches of papaverine hydrochloride. Int J Res. Pharm Sci. 2010; 1(3): 259-66.
9. Hosseini B, Hashemi H, Shahriari F, Marashi H. Isolation and cloning of sat gene in Papaver somniferum and evaluation of its transient expression. Journal of Horticulture. 2008; 22(2): 77-86.
10. Zhuang Y, Cai X, Yu J, Ju H. Flow injection chemiluminescence analysis for highly sensitive determination of noscapine. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2004; 162: 457–62.
11. Sato N, Mizumoto K, Kusumoto M, Niiyama H, Maehara N, Ogawa T, Tanaka M. 9-Hydroxyellipticine inhibits telomerase activity in human pancreatic cancer cells. FEBS Lett. 1998; 441(2): 318-21.
12. Wu H, Hsu CY, Liu WH, Yung BY. Berberine-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells is associated with down-regulation of nucleophosmin/B23 and telomerase activity. Int J Cancer. 1999; 81: 923–9.
13. Erguven M, Akev N, Ozdemir A, Karabulu Et, Bilir A.The inhibitory effect of suramin on telomerase activity and spheroid growth of C6 glioma cells. Biological Sciences. 2008; 14(8): 165-73.
14. Zhou JL, Lu YJ, Ou TM, Zhou GM, Huang Z, Zhu XF, Du CJ, Bu XZ, Ma L, Gu LQ, Li YM, Chan AS. Synthesis and evaluation of quindoline derivatives as G-quadruplex inducing and stabilizing ligands and potential inhibitors of telomerase. J Med Chem. 2005; 48 (23): 7315–21.
15. Guittat L, Alberti P, Rosu F, Van Miert S, Thetiot E, Pieters L, Gabelica V, De Pauw E, Ottaviani A, Riou JF, Mergny JL. Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. Biochimie. 2003; 85(5): 535-47.
16. Mahadevan B, Keshava C, Musafia-Jeknic T, Pecaj A, Weston A, Baird W. Altered gene expression atterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. Cancer Res .2005; 65(4): 1251-8.

17. Lu YY, Jing DD, Xu M, Wu K, Wang XP. Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line. World J Gastroenterol. 2008; 14(35): 5403-11.
18. Cheng AJ, Lin JD, Chang T, Wang TC. Telomerase activity in benign and malignant human thyroid tissues. Br J Cancer.1998; 77(12): 2177-80.
19. Bollag DM, Rozycki MD, Stuart JE. Protein methods. Wiley-Liss, New York. 1991:51-55.
20. Hou M, Xu D, Byorkltolm M, Gruber A. Real-Time Quantitative Telomeric Repeat Amplitication protocol Assay for the detection of telomerase activity. Clin chem. 2001; 47(3): 519-24.
21. Li H, Xu D, Li J, Berndt MC, Liu JP. Transforming growth factor _ suppresses Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) by Smad3Interactions with c-Myc and the hTERT Gene. The Journal of Biological Chemistry.2006; 281(35): 25588–600.
22. Kazemi Nureini S., wink M. Transcriptional down regulation of hTERT and senescence induction in HepG2 cells by chelidonine. World J Gastroenterol. 2009 ;15(29): 3603-10.
23. Simonsson T, Sjoback R. DNA tetraplex formation studied with fluorescence resonance energy transfer. The Journal of Biological Chemistry.1999; 274(24)17379-83.
24. Uglyanitsa KN, Nefyodov LI, Doroshenko YM, Nowicky JW, Volchek IV, Brzosko WJ, Hodysh YJ. Ukrain: a novel antitumor drug. Drugs Exp Clin Res. 2000; 26(5-6): 341-56.
25. Xiao X, Athanasiou M, Sidorov I, Horikawa I, Cremona G, Blair D, Barret JC, Dimitrov DS. Role of Ets/Id proteins for telomerase regulation in human cancer cells. Exp Mol Pathol. 2003;75(3) : 238–47.
26. Caprio V, Guyen B, Opoku-Boahen Y, Mann J, Gowan SM, Kelland LM, Read MA, Neidle S. A Novel Inhibitor of Human Telomerase Derived from 10H-Indolo[3,2-b]quinoline. Bioorg Med Chem Lett. 2000;10(18): 2063-66.
27. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T.p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomereslacking TRF2. Science.1999;283(5406):1321–5.
28. Izbicka E,Wheelhouse RT, Raymond E,Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, Windle BE, Hurley LH, Von Hoff DD. Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents inhuman tumor cells. Cancer Res.1999; 59(3): 639–44.
29. Maiti M , Kumar G.S. Polymorphic Nucleic Acid Binding of Bioactive Isoquinoline Alkaloids and Their Role in Cancer. Journal of Nucleic Acids.2010; Article ID 593408. doi:10.4061/2010/593408.
30. Naasani I, Seimiya H, Yamori T, Tsuruo T. FJ5002:a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis.Cancer Res.1999; 59(16): 4004–11.
31. Franceschin M, Rossetti L, Dambrosio A, Schirripa S, Bianco A, Ortaggi G, Savino M, Schultes C, Neidle S. Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives. Bioorg Med Chem Lett. 2006; 16(6): 1707–11.
32. Shammas MA, Koley H, Beer DG, Li C, Goyal RK, Munshi NC. Growth arrest, apoptosis, and telomere shortening of Barrett's-associated adenocarcinoma cells by a telomerase inhibitor. Gastroenterology. 2004; 126(5):1337-46.
33. Akiyama M, Hideshima T, Munshi NC, Anderson KC. Telomerase inhibitors as anticancer therapy. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2002; 2(5):567-75.
34. Rubis B, Kaczmarek M, Szymanowska N, Galezowska E, Czyrski A, Juskowiak B, Hermann T, Rybczynska M. The biological activity of G-quadruplex DNA binding papaverine-derived ligand in breast cancer cells. Invest New Drugs. 2009; 27(4):289-96.
35. Zhao JQ, Hoare SF, McFarlane R, Muir S, Parkinson EK, Black DM, Keith WN. Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences. Oncogene. 1998; 16(10): 1345-50.
36. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell. 1997; 90(4): 785-95.

Investigation of Telomerase activity and hTERT gene expression in MCF7 cells treated with papaverine

Kazemi Noureini S., Ph.D
Assistant Professor, Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Nabiuni M., Ph.D
Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Noori ZA., MSc
MSc Student of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, , Tehran, Iran.

Received:02/07/2012**, Revised:**23/08/2012 **, Accepted:** 15/11/2012

Corresponding author:
Sabzevar University of Hakim Sabzevari, Faculty of Science, Department of Biological, Dr. Sakineh Kazemi
E-mail: kazemibio@gmail.com

Abstract

Introduction: Telomere maintenance is essential for the continued proliferation of dividing cells, and is implicated in chromosome stability and cell immortalization. Telomerase activity, that allows cancer cells to maintain their telomeric DNA for an indefinite replicative capacity, is an attractive target against cancer. A well known benzylisoquinoline alkaloid, papaverine, we focused on to evaluate its antiproliferaive effects on breast cancer MCF7 cells.

Methods: Cytotoxicity of the commercially available pure compound papaverine HCl (Sigma) was determined by MTT assay. A modified quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)-based telomerase repeat amplification protocol (TRAP) was used to estimate relative telomerase activity in papaverine-treated cells in comparison with the untreated control cells. Relative expression level of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) gene was estimated using real time reverse transcription-PCR (RT-PCR).

Results: IC50 concentration of papaverine after 48 hours treatment was measured to 120 micromolar. At this concentration telomerase activity showed a considerable decrease (almost 70% in comparison with untreated control cells), in a concentration dependent manner. Quantitative real-time RT-PCR experiments indicated a similar reduction in transcription level of hTERT gene under treatment with papaverine.

Conclusion: Papaverine is a potent natural compound in suppression of cancer cell immortality most probably by anti-telomerase activity. It is a valuable putative compound for further development of promising anti-cancer agents.

Key words: *Telomerase, papaverine, Cancer, alkaloids*