ORIGINAL ARTICLE

Expression of Oncoprotein Gankyrin in Drug Resistant and Sensitive Cancer Ovarian and Gastric Cancer Cell Lines

Maryam Taheri[1],
Khadijeh Jamialahmadi[2,3],
Fatemeh Kalalinia[4]

[1] MSc in Biochemistry, Faculty of Science, Payam Noor University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[3] Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4] Associate Professor, Biotechnology Research Center, Institute of Pharmaceutical Technology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received June 8, 2017 ; Accepted November 26, 2017)

Abstract

Background and purpose: Multidrug resistance (MDR) phenotype is a major complication in cancer chemotherapy. Gankyrin is a key point molecule in cell cycle regulation and may contribute to drug-resistance phenotype of tumor cells. The aim of this study was to compare the basal Gankyrin expression level in ovarian and gastric drug-resistant cells with their parental drug-sensitive cells.

Materials and methods: In this experimental study, the Gankyrin expression at mRNA and protein levels in drug resistance cell lines was compared with their parental drug sensitive cell lines by real time RT-PCR and Western blotting.

Results: Gankyrin mRNA expression in A2780/RCIS cells was statistically lower than A2780 cells (p= 0.00) but their difference was not statistically significant at protein level (p= 0.240). In addition, Gankyrin expression in EPG85-257/RDB was lower than its parental drug sensitive cell line at mRNA and protein level.

Conclusion: This study found an opposite relationship between Gankyrin expression and MDR phenotype related to the overexpression of MDR transportes. This suggestes for the first time that the incidence of MDR phenotype could inhibit tumorgenisity.

Keywords: gankyrin, multidrug resistance, ovarian cancer, gastric cancer

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (161): 12-23 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۱ خرداد سال ۱۳۹۷ (۲۳-۱۲)

بررسی میزان بیان اونکوپروتئین گانکیرین در رده های سلولی سرطان تخمدان و معده مقاوم و حساس به داروهای ضد سرطان

مریم طاهری[۱]
خدیجه جامی الاحمدی[۲و۳]
فاطمه کلالی نیا[۴]

چکیده

سابقه و هدف: بروز فنوتیپ مقاومت چند دارویی از مهم‌ترین دلایل ناکارآمد بودن رژیم‌های شیمی درمانی است. گانکیرین از معدود پروتئین های انکوژنی است که به عنوان تنظیم‌کننده منفی مسیرهای مهم سرکوبگر تومور نقش مهمی را در پیشبرد روند سرطانی شدن سلول‌ها ایفا می‌نماید. در این مطالعه، در یک غربالگری اولیه به مقایسه میزان بیان پایه گانکیرین در سلول های مقاوم به داروی سرطان تخمدان و معده انسانی با سلول‌های والد حساس به دارو، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، میزان بیان انکوپروتئین گانکیرین در سطح mRNA و پروتئین در رده‌های سلولی مقاوم به دارو با بیان آن در رده‌های سلولی والد حساس به دارو به ترتیب با استفاده از تکنیک‌های Real Time RT-PCR و Western Blotting مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان گانکیرین در سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به دارو (A2780/RCIS بیان‌کننده ترانسپورترهای مقاومت دارویی MRP2) (p=۰/۰۰) در مقابل رده سلولی والد حساس به دارو در سطح mRNA بود (p=۰/۲۴۰). هم‌چنین بیان گانکیرین در رده‌های سلول سرطان معده مقاوم (EPG85-257/RDB بیان‌کننده ترانسپورترهای مقاومت دارویی MDR1) در سطح mRNA و پروتئین کم‌تر از سلول والد حساس به داروی آن بود.

استنتاج: در مجموع نتایج این تحقیق نشان‌دهنده ارتباط معکوس بین میزان بیان گانکیرین با بروز فنوتیپ مقاومت دارویی از طریق افزایش بیان پمپ‌های ترانسپورتر دارویی بود. لذا، این فرضیه پیشنهاد می‌شود که افزیش بیان‌ترانسپورترهای دارویی می‌تواند مهارکننده خواص مهاجم تومورزا در سلول‌های سرطانی باشد.

واژه های کلیدی: گانکیرین، مقاومت چند دارویی، سرطان تخمدان، سرطان معده

مقدمه

شیمی درمانی یکی از موثرترین راه‌های درمان تومورهای بدخیم است، با این وجود گاهی داروها قادر به کشتن سلول‌های توموری نمی‌باشند(۱،۲). یکی از مشکلات اصلی در شیمی درمانی سرطان‌ها، بروز مقاومت چند دارویی (Multi drug resistance (MDR)) است که در آن سلول‌های سرطانی که در معرض یک داروی

مولف مسئول: فاطمه کلانی نیا– مشهد: دانشگاه علوم پزشکی مشهد، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی E-mail: Kalaliniaf@mums.ac.ir
۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشمی، دانشکده علوم، پیام نور مشهد، مشهد، ایران
۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوریهای نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوریهای نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۳/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۳/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۹/۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

ضدسرطان قرار گرفته‌اند، به داروهای ضدسرطان دیگری که از نظر ساختمان و عملکرد با داروی اولیه متفاوت هستند، مقاومت نشان می‌دهند(۱). زمانی که مقاومت ایجاد می‌شود باید از مقدار بیش‌تری دارو به منظور غلبه بر مقاومت استفاده شود، در این حالت نه فقط عوارض جانبی ظاهر می‌شود، بلکه این‌عمل باعث بالا رفتن مقاومت سلول‌ها به دارو می‌شود(۲). مسیرهای مولکولی مختلفی در بروز فنوتیپ مقاومت چند دارویی دخیل می‌باشد همانند کاهش جذب دارو، افزایش بیرون انداختن (Efflux) دارو از سلول، کاهش فعالیت دارو، افزایش غیرفعال بودن دارو، بیان بیش از حد هدف دارو، موتاسیون هدف دارو و افزایش بازسازی آسیب دارو(۳). افزایش بیرون انداختن دارو از سلول توسط پمپ‌های غشایی، معمول‌ترین علت مقاومت دارویی مشاهده شده در تحقیقات آزمایشگاهی و کاربردهای بالینی است. این پروتئین‌های ترانسپورتر دارویی متعلق به خانوادهٔ پروتئین‌های متصل شونده به ATP (ATP-binding cassette transporters (ABC transporters)) هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به MDR1 (Multidrug-resistance gene 1)، MRP1 (Multidrug-resistant protein 1) و MRP2 (Multidrug-resistant protein 2) اشاره نمود(۷،۶). گانکیرین (Gankyrin (also khnown as PSMD10 or P28GANK)، انکوپروتئین جدیدی است با وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون که حاوی ۲۲۶ اسید آمینه در هفت تکرار آنکیرین است. این پروتئین نقش‌های متعددی را در پیشرفت سیکل سلولی، مهار آپوپتوز و نیز ایجاد و پیشرفت سرطان ایفا می‌کند(۱). گانکیرین سه عملکرد سلولی اصلی دارد. اول، بیان گانکیرین با هیپرفسفوریلاسیون و تجزیه پروتئین رتینوبلاستوما که یک فاکتور تومور ساپرسور است مرتبط می‌باشد که در نتیجه باعث کاهش عملکرد رتینوبلاستوما می‌شود(۴،۵). دوم، گانکیرین به پروتئین E3 یوبی کوئیتین لیگاز MDM2 (Mouse double minute 2) متصل می‌شود و تخریب P53 را تسهیل می‌کند، این عمل از فعالیت ژن‌های آپوپتوتیک وابسته به P53 ممانعت کرده و به زنده ماندن سلول، بی‌ثباتی ژنوم و تغییر شکل انکوژنی کمک می‌کند(۷،۶). سوم، اتصال گانکیرین به CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4)، عملکرد مهاری پیشرفت سیکل سلولی تومور ساپرسور P16INK4A و P18INK4A را خنثی می‌کند(۸). این عمل باعث فسفوریلاسیون Rb (Retinoblastoma)، فعالیت فاکتور رونویسی E2F و پیشرفت سیکل سلولی می‌شود(۹). بنابراین در مجموع گانکیرین با اثر منفی بر دو مسیر پیام رسانی وابسته به pRb و P53، نقش مهمی در شکل‌گیری بسیاری ازسرطان‌ها ایفا می‌کند(۱۰). اخیراً نشان داده شده است که افزایش بیان گانکیرین مرتبط با بروز فنوتیپ مقاومت دارویی از طریق تغییر در بیان برخی از پروتئین‌های موثر بر مسیر آپوپتوز همانند Bcl-2، Bax، E2F-1، کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ می‌باشد(۱۱). هم‌چنین مشخص شده است که سطح بالای مقاومت دارویی در برخی سلول‌های توموری در نتیجه بروز موتاسیون در P53 و در نتیجه نقص عملکرد آن می‌باشد(۱۲). این مشاهدات تقویت‌کننده این فرضیه هستند که گانکیرین می‌تواند در شکل‌گیری فنوتیپ مقاومت دارویی نقش مهمی داشته باشد. در این مطالعه، در یک غربالگری اولیه، میزان بیان پایه گانکیرین در سلول‌های مقاوم به دارو (که هر یک به عنوان مدلی از افزایش بیان یکی از دو پروتئین اصلی دخیل در مقاومت دارویی MDR1 و MRP2 مطرح هستند) با سلول‌های والد حساس به دارو، مقایسه شد.

مواد و روش ها

مواد

محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640) و سرم جنین گاوی ((FBS (Fetal Bovine Serum) از شرکت Gibco کشور استرالیا خریداری شد. تریپان بلو، پنی‌سیلین-استرپتومایسین و واکنشگر برادفورد از شرکت Sigma

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

آلمان تهیه شدند. آنتی‌بادی پلی کلونال ضد گانکیرین از شرکت Santa Cruz آمریکا، آنتی‌بادی ضد بتا اکتین از شرکت Sigma آلمان و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP (Horseradish peroxidase) از شرکت Abcam آمریکا خریداری شد. لدر پروتئینی از شرکت Thermo Scientific آلمان خریداری گردید. پرایمرها از شرکت Metabion آلمان، کیت استخراج RNA (TriPure Isolation Reagent Kit) از شرکت Roche آلمان و کیت واکنش Real Time RT-PCR از شرکت Takara ژاپن خریداری شد.

کشت سلولی

همه رده‌های سلولی مورد استفاده در این تحقیق تجربی، توسط پروفسور هرمان لاگه (گروه پاتولوژی مولکولی، دانشگاه چریته، برلین، آلمان) به این آزمایشگاه هدیه شده بودند. رده‌های سلولی مورد استفاده عبارت بودند از رده سلولی سرطان تخمدان انسانی مقاوم به سیس پلاتین A2780/RCIS به عنوان مدل سلولی که MRP2 را درسطح بالایی بیان می‌کند و سلول والد حساس به داروی آن یعنی A2780، رده سلولی‌سرطان معده انسانی مقاوم به دوکسوروبیسین EPG85-257/RDB به عنوان مدل سلولی که MDR1 را در سطح بالایی بیان می‌کند و سلول والد حساس به داروی آن یعنی EPG85-257. همه رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI-1640 استاندارد حاوی (v/v) ۱۰ درصد FBS، L-گلوتامین ۲ mM و آنتی بیوتیک (استرپتومایسین ۱۰۰ µg/mL، پنی‌سیلین ۱۰۰ U/mL) کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ °C و اتمسفر حاوی ۵ درصد CO2 رشده داده می‌شدند.

انجام واکنش Real Time RT-PCR

سلول‌ها درون پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و پس از رسیدن به کانفلوئنسی ۷۰ درصد، RNA توتال سلول‌ها مطابق با پروتوکل کیت Tripure Isolation Reagent استخراج شد. تعیین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل Thermo scientific NanoDrop1000 اندازه‌گیری شد و خلوص RNA با نسبت‌های ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ بررسی می‌شد. RNA به دست آمده بلافاصله در فریزر ۸۰- °C برای بررسی‌های بعدی نگهداری شد. به‌منظور بررسی بیان گانکیرین، MRP1، MRP2 و MDR1، واکنش Real Time RT-PCR روی نمونه‌های RNA با استفاده از کیت One Step SYBR ® PrimeScriptTM RT-PCR (Takara) و دستگاه Real time cycler Mx3000P™ Stratagen انجام شد. توالی‌های پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از توالی فوروارد گانکیرین: 5´-AGC AGC CAA GGG TAA CTT GA-3´، توالی ریورس گانکیرین: 5´-TAC TTG CTC CTT GGG ACA CC-3´ (۱۳)، توالی فوروارد MRP-1: 5´-GTG TTT CTG GTC AGC CCA ACT-3´، توالی ریورس MRP-1:-5´ TTG GAT CTC AGG ATG GCT AGG-3´ (۱۴)، توالی فوروارد MRP-2: 5′-AGC AGC CAT AGA GCT GGC CCT T-3′، توالی ریورس MRP-2: -5′ AGC AAA ACC AGG AGC CAT GTG CC-3′ (۱۵)، توالی فوروارد MDR-1: 5´-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3´، توالی ریورس MDR-1: 5´-TGT TCA AAC TTC TGC TCC TGA-3´ (۱۶) و توالی فوروارد بتا اکتین: 5´-TAC TGA AGT GTG ACG TGG ACA TC-3´ و توالی ریورس بتا اکتین: 5´-CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA TCT-3´ (۱۷،۱۸). حجم هر واکنش ۲۵ µL و حاوی ۱۲/۵ µL از بافر 2X One Step SYBR ® RT-PCR، ۱ µL از آنزیم PrimeScriptTM 1 step Enzyme Mix II، ۲ µL از RNA توتال (۲۵۰ نانوگرم)، ۱ µL از آنزیم ریورس ترانسکریپتاز، ۱ µL از هر یک از پرایمرها و در نهایت ۷/۵ µL از آب فاقد RNase بود.

سیکل دمایی به کار برده شده بدین صورت تنظیم شد که در ابتدا مرحله ساخت cDNA در دمای ۴۲ °C برای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

مدت ۵ دقیقه انجام شده و بعد از مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C برای مدت ۱۰ ثانیه، مرحله تکثیر توالی هدف در ۴۰ سیکل دمایی شامل ۹۵ °C به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه انجام می‌شد. در نهایت برای اطمینان از اختصاصی بودن محصول تولید شده، آنالیز منحنی ذوب انجام شد. در هر نمونه میزان بیان هر ژن در مقابل میزان بیان ژن بتااکتین با استفاده از نرم‌افزار MxPro-Mx3000P نرمالیزه شد و نتایج به صورت نسبت میزان بیان هر ژن در سلول مقاوم به میزان بیان آن در ژن در سلول والد حساس به دارو بیان شد.

وسترن بلاتینگ

جهت بررسی و مقایسه میزان بیان پروتئین گانکیرین در سلول‌های والد و مقاوم، سلول‌ها با استفاده از بافر NP-40 (Nonidet-P40) لیز و پروتئین آن‌ها جداسازی شد. بدین ترتیب که پس از رسیدن به کانفلوئنسی ۷۰ درصد، سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند. سپس روی پلیت حاوی ۳×۱۰^{۶} سلول، ۱۰۰ µL بافر لیزکننده سلولی ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد. لیزات توسط سونیکاتور پروب دار (Bandelin, uw mini20) طی سه سیکل ۲۰ ثانیه‌ای با قدرت ۲۰ درصد و با ۲ دقیقه فاصله بین هر سیکل سونیکیت شد و در نهایت در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ °C سانتریفوژ گردید. محلول رویی با احتیاط برداشته شد، به طوری که با پلیت مخلوط نشود و به یک میکروتیوپ دیگر منتقل شد. محلول رویی که حاوی Total Protein بود، در فریزر ۲۰- °C نگهداری شد تا هنگامی که وسترن بلات انجام گرفت. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد تعیین شد. ۵۰ میکروگرم پروتئین دناتوره شده و روی ژل (w/v) ۱۵درصد SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) در ولتاژ ۱۱۰V، در دمای اتاق برای مدت حدود یک ساعت الکتروفورز و سپس به غشاء PVDF (Polyvinylidene fluoride) انتقال داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با بافر بلاک کننده حاوی BSA (w/v) ۲ درصد، غشاها به مدت یک شب در دمای ۴ °C با آنتی بادی اولیه خرگوشی ضد گانکیرین انسانی در رقت ۱:۲۵۰ یا آنتی بادی اولیه موشی ضد بتااکتین انسانی در رقت ۱:۵۰۰۰ انکوبه شدند. پس از ۲ بار شستشو با PBS (Phosphate-buffered saline)، غشاء با آنتی بادی ثانویه ضد آنتی‌بادی اولیه خرگوشی یا ضد آنتی بادی اولیه موشی کانژوگه با HRP، به ترتیب در رقت ۱:۲۰۰۰ و ۱:۷۰۰۰ برای مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از ۲ بار شستشو، غشاء ها با واکنشگر افزایش کمی لومینه سنس به مدت ۲ دقیقه مجاور شدند و باندها توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن Syngene نمایان شدند. در نهایت دانسیته باندها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ 1.46r اندزاه‌گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

همه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way-ANOVA) به همراه Tukey's post-hoc استفاده شد. نتایج به صورت Mean ± SD ارائه گردید و $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. تعداد ستاره‌های موجود در هر نمودار نشان دهنده حدود p value است: (*($p < ۰/۰۵$)، **($p < ۰/۰۱$)، ***($p < ۰/۰۰۱$).

یافته ها

میزان کارایی واکنش Real Time RT-PCR برای تکثیر ژن های مورد مطالعه

جهت بررسی میزان کارایی واکنش PCR برای تکثیر ژن‌ها برای هر ژن مورد نظر منحنی استاندارد نسبی با استفاده از غلظت‌های ۱ تا ۵۰۰ ng از RNA توتال (رقت هایی از RNA با نسبت ۱ به ۴) رسم شد (نمودار شماره ۱). نتایج نشان دادند که واکنش PCR برای ژن‌های MRP1، MRP2، MDR1، گانکیرین و بتا اکتین به ترتیب با کارآیی ۱۰۵/۴۹ درصد، ۸۰/۰۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

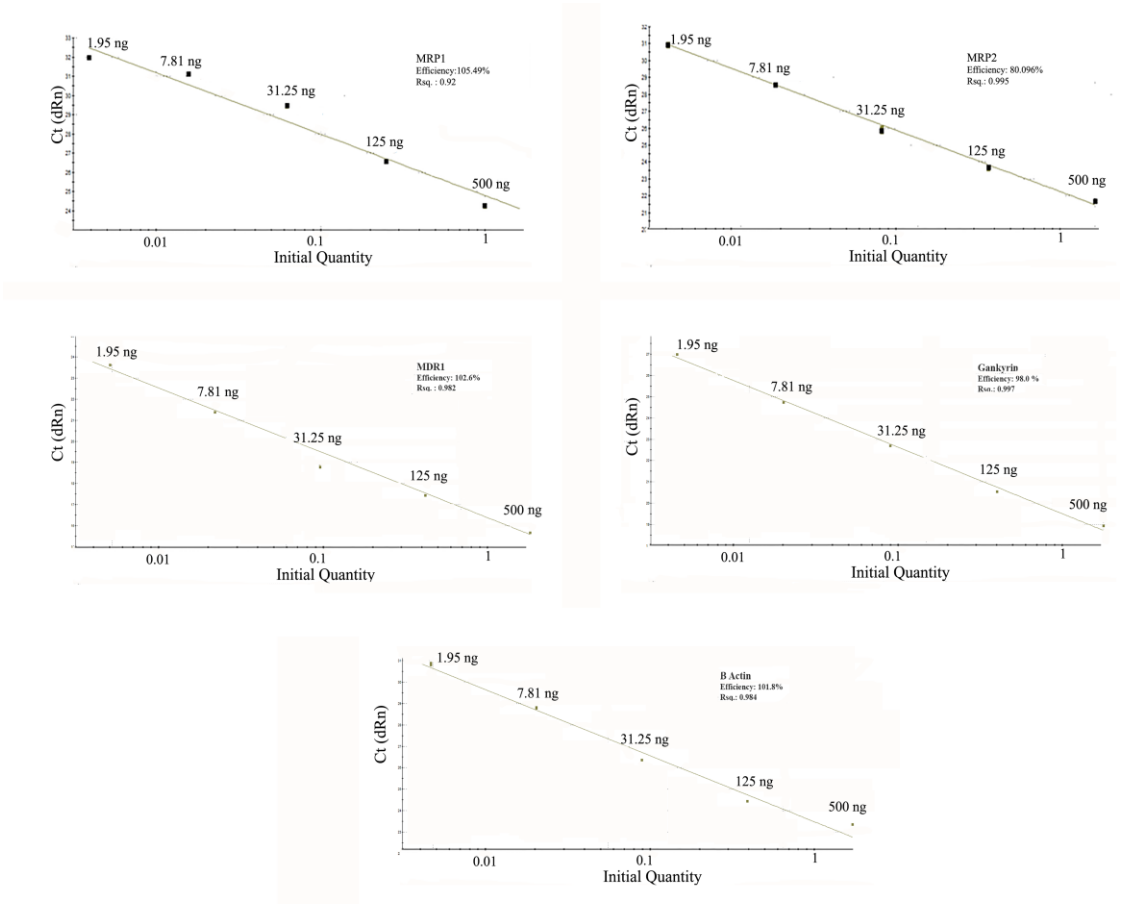
درصد، ۱۰۲/۶ درصد، ۹۸/۰ درصد و ۱۰۱/۸ درصد در محدوده تحت بررسی انجام شد.

میزان بیان MRP1 و MRP2 در رده های سلولی سرطان تخمدان

تفاوت میزان بیان MRP1 و MRP2 در سطح mRNA بین رده سلول سرطان تخمدان مقاوم به داروی A2780/RCIS و رده سلول والد غیرمقاوم به داروی آن به روش Real time RT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح بیان MRP1 و MRP2 در سلول A2780/RCIS به ترتیب ۱/۲۹ و ۱۳/۳۲ برابر سطح بیان آن ها در رده سلولی A2780 است (نمودار شماره ۲).

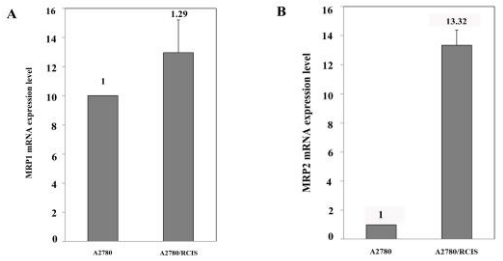
میزان بیان گانکیرین در رده های سلولی سرطان تخمدان

بررسی میزان تفاوت بیان گانکیرین در سطح mRNA بین دو رده سلولی مقاوم به داروی A2780/RCIS و رده سلول والد غیرمقاوم به داروی آن به روش Real time RT-PCR نشان داد که میزان بیان گانکیرین در رده سلولی مقاوم به صورت معنی‌داری و در حدود ۵۴ درصد کم‌تر از میزان بیان آن در رده سلولی والد است (نمودار شماره ۳A). از سوی دیگر، اگر چه نتایج بررسی سطح بیان پروتئین گانکیرین به روش وسترن بلاتینگ نشان داد که سطح بیان پروتئین گانکیرین در رده سلولی A2780/RCIS بیش از رده سلولی A2780 است، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود (نمودار شماره ۳B و C).

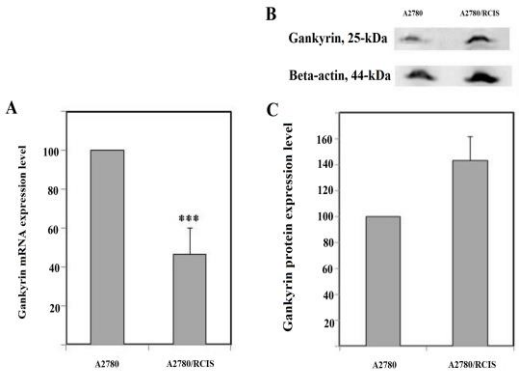


نمودار شماره ۱: منحنی استاندارد نسبی ژن های مورد بررسی در واکنش Real Time RT-PCR. جهت بررسی میزان کارایی واکنش PCR برای تکثیر ژن ها برای هر ژن مورد نظر منحنی استاندارد نسبی با استفاده از غلظت های ۱ تا ۵۰۰ ng از RNA توتال (رقت هایی از RNA با نسبت ۱ به ۴) رسم شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]



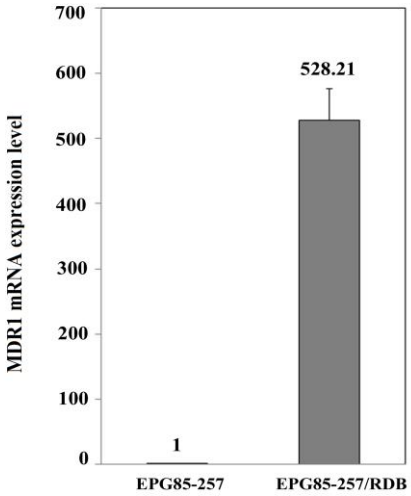
نمودار شماره ۲: بررسی میزان بیان پایه MRP1 و MRP2 در سطح mRNA در رده های سلولی سرطان تخمدان با استفاده از روش Real time RT-PCR. سطح بیان هر ژن با استفاده از داده های حاصل از سطح بیان ژن بتا اکتین نرمالیزه شده است. هر ستون در نمودار نمایانگر میانگین ± انحراف معیار (SD) حاصل از حداقل سه بار تکرار می باشد.



نمودار شماره ۳: بررسی میزان بیان پایه گانکیرین در سطح mRNA (A) و پروتئین (B و C) در رده های سلولی سرطان تخمدان. A؛ میزان بیان پایه گانکیرین در سطح mRNA با استفاده از روش Real time RT-PCR انجام شد. سطح بیان هر ژن با استفاده از داده های حاصل از سطح بیان ژن بتا اکتین نرمالیزه شده اند. B و C؛ سطح بیان پروتئین گانکیرین در رده سلولی مقاوم به دارو (A2780/RCIS) و مقایسه آن با میزان بیان این انکوپروتئین در رده سلولی والد غیرمقاوم به دارو (A2780) با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ انجام شد. دانسیته باندها به کمک نرم افزار ImageJ 1.46r آنالیز شد و میزان بیان گانکیرین در مقابل میزان بیان پروتئین بتا اکتین همان نمونه نرمالیزه شد. هر ستون در نمودار نمایانگر میانگین±انحراف‌معیار (SD) حاصل از حداقل سه بار تکرار می‌باشد و *** نشان دهنده $p < ۰/۰۰۱$ می باشد.

میزان بیان MDR1 در رده های سلولی سرطان معده

تفاوت میزان بیان MDR1 در سطح mRNA بین رده سلول سرطان معده مقاوم به دارو (EPG85-257/RDB) و رده سلول والد غیرمقاوم به داروی آن به روش Real time RT-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که رده سلولی مقاوم به دوکسوروبیسین به‌طور بسیار قابل توجهی و در حدود ۵۲۸ برابر سلول والد EPG85-257، MDR1 را بیان می کند (نمودار شماره ۴).

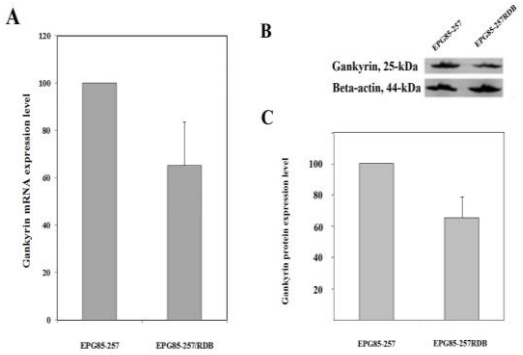


نمودار شماره ۴: بررسی میزان بیان پایه MDR1 در سطح mRNA در رده‌های سلولی سرطان معده با استفاده از روش Real time RT-PCR. سطح بیان هر ژن با استفاده از داده های حاصل از سطح بیان ژن بتااکتین نرمالیزه شده است. هر ستون در نمودار نمایانگر میانگین ±انحراف معیار (SD) حاصل از حداقل سه بار تکرار می باشد.

میزان بیان گانکیرین در رده های سلولی سرطان معده

بررسی میزان تفاوت بیان گانکیرین در سطح mRNA بین دو رده سلولی مقاوم به دارو (EPG85-257/RDB) و رده سلول والد غیرمقاوم به داروی آن به روش Real time RT-PCR نشان داد که میزان بیان گانکیرین در رده سلولی مقاوم در حدود ۳۳ درصد کم تر از میزان بیان آن در رده سلولی والد است (نمودار شماره ۴A). به طور مشابه نتایج بررسی سطح بیان پروتئین گانکیرین به روش وسترن بلاتینگ نشان داد که سطح بیان پروتئین گانکیرین در رده سلولی EPG85-257/RDB در حدود ۲۴ درصد کم تر از رده سلولی والد EPG85-257 است. این تفاوت ها از لحاظ آماری معنی دار نبود (نمودار شماره ۵B و C).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]



نمودار شماره ۵: بررسی میزان بیان پایه گانکیرین در سطح mRNA (A) و پروتئین (B و C) در رده های سلولی سرطان معده. A؛ میزان بیان پایه گانکیرین در سطح mRNA با استفاده از روش Real time RT-PCR انجام شد. سطح بیان هر ژن با استفاده از داده های حاصل از سطح بیان ژن بتا اکتین نرمالیزه شده اند. B و C؛ سطح بیان پروتئین گانکیرین در رده سلولی مقاوم به دارو (EPG85-257/RDB) و مقایسه آن با میزان بیان این انکوپروتئین در رده سلولی والد غیرمقاوم به دارو (EPG85-257) با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ انجام شد. دانسیته باندها به کمک نرم افزار ImageJ 1.46r آنالیز شد و میزان بیان گانکیرین در مقابل میزان بیان پروتئین بتا اکتین نرمالیزه شد. هر ستون در نمودار نمایانگر میانگین ± انحراف معیار (SD) حاصل از حداقل سه بار تکرار می باشد.

بحث

مقاومت دارویی نسبت به داروهای مختلف ضد سرطان یکی از مشکلات اساسی و عمده در درمان سرطان می‌باشد(۲۴). مقاومت دارویی مشاهده شده در سرطان معده و تخمدان حاصل از عوامل مختلفی می‌باشد که به نظر می‌رسد مکانیسم‌های متعددی بیش از آن چیزی که تاکنون شناخته شده‌اند، در بروز آن‌ها دخیل باشد(۲۶،۲۵). لذا دانستن بهتر این مکانیسم‌ها می‌تواند به پیش‌بینی وقوع مقاومت دارویی کمک نماید و در نهایت منجر به طراحی روش‌های درمانی موثرتر برای بیمارانی که به درمان‌های معمولی پاسخ نمی‌دهند، شود.

گانکیرین یک پروتئین با ساختار بسیار حفاظت شده در پستاندارن است که در سال‌های اخیر به عنوان یک انکوپروتئین شناخته شده است(۲۷،۸). گانکیرین عمدتاً از طریق تنظیم منفی دو مسیر مهم سرکوبگر تومور شامل مسیر INK4-CDK-pRb و ARF-MDM2-P53 عمل می‌نماید(۲۳). نقش کلیدی افزایش بیان گانکیرین در تومورزایی در بسیاری از سرطان‌های انسانی همانند سرطان‌های ریه، کبد، دهان، مری، معده، کولورکتال، پانکراس، پستان، تخمدان و دهانه رحم نشان داده شده است(۱۳، ۳۳- ۲۴). از سوی دیگر، نشان داده شده است که گانکیرین می‌تواند باعث القای مقاومت به درمان با داروهای مورد استفاده در شمی درمانی شوند، به عنوان مثال می‌توان به القای مقاومت به داروی سورافینیب در درمان کارسینومای هپاتوسلولار توسط گانکیرین اشاره نمود(۳۴).

در مطالعه دیگری در رده سلولی سرطان معده نشان داده شد که بیان گانکیرین در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال افزایش یافته است و این افزایش باعث افزایش رشد و تکثیر سلولی و کاهش آپوپتوز در آن‌ها شده بود. محققان توانستند نشان دهند که کاهش بیان گانکیرین در این سلول‌ها می‌تواند باعث کاهش مقاومت به داروهای ۵-فلورواوراسیل و سیس پلاتین می‌شود(۳۵).

شواهدی دال بر وجود ارتباط بین گانکیرین و تنظیم بیان پروتئین های MDR وجود دارد. در مطالعه‌ای که با هدف بررسی علت مقاومت برخی از تومورها به آرسنیک تری‌اکساید (AS) انجام گرفته است، دو رده سلولی مقاوم به AS (سلول های سرطان‌های کبد (HepG2/AS) و معده (SGC7901/AS) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی بیان ژن‌های مختلف در این سلول‌های مقاوم و مقایسه آن‌ها با سلول‌های والد نشان داد که میزان بیان ترانسپورترهای ABCB1،ABCC1 و ABCC2 در سلول‌های مقاوم بالاتر از سلول‌های والد بوده است. هم‌چنین میزان بیان پروتئین‌های P53، MDM2 و گانکیرین و نیز میزان فسفریلاسیونRb در سلول‌های مقاوم افزایش یافته بود. این محققان مطرح نمودند که غیر فعال شدن P53 و Rb به علت حضور گانکیرین و MDM2، احتمالاً علت بروز مقاومت دارویی در این سلول‌ها بوده است(۲۴).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

این مطالعه با هدف بررسی میزان بیان انکوپروتئین گانکیرین در رده های سلولی مقاوم به دارو در مقایسه با رده‌های سلولی والد غیرمقاوم به دارو انجام شد. به منظور بررسی جامع‌تر ارتباط با مقاومت دارویی، تلاش شد از رده‌های سلولی مختلفی که هر کدام به عنوان مدلی از افزایش بیان یکی از دو پمپ اصلی دخیل در مقاومت دارویی به شمار می‌آیند، استفاده شود. این رده‌های سلولی شامل A2780/RCIS (مدلی برای ترانسپورتر MRP2) و EPG85-257/RDB (مدلی برای ترانسپورتر MDR1) بودند. سیس پلاتین (Cisplatin) یکی از پرکاربردترین داروهای مورد استفاده در درمان سرطان‌ها به خصوص در رژیم‌های چندداروویی است(۳۶). مشاهده شده است که بروز مقاومت به سیس پلاتین در رده سلول سرطان تخمدان انسانی A2780 به علت افزایش بیان پمپ غشایی MRP2 می‌باشد(۳۷). دوکسوروبیسین (Doxorubicin) که با نام آدریامایسین (Adriamycin) نیز شناخته می شود، از دسته داروهای آنتراسیکلینی است که هنوز هم به عنوان داروهای اصلی ضدسرطان القاکننده مسیرهای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی مختلف می‌باشند(۳۸). نشان داده شده است که افزایش بیان MDR1 در رده سلول سرطان معده انسان EPG85-257 باعث مقاومت به داروی دوکسوروبیسن می‌شود(۳۹). در این مطالعه نیز در ابتدا، بیان بالای MRP2 و MDR1 در رده‌های سلولی مقاوم نسبت به رده‌های سلولی والد غیرمقاوم به دارو به‌کمک روش‌های Real time-RT-PCR نشان داده شد. در ادامه، بررسی میزان بیان ژن گانکیرین در دو سطح mRNA و پروتئین، به ترتیب به کمک روش‌های Real time-RT-PCR و وسترن بلات انجام گرفت.

نتایج نشان دادند که سطح بیان mRNA گانکیرین در رده سلولی A2780/RCIS به صورت معنی‌داری کم‌تر از سطح بیان mRNA گانکیرین در رده سلولی A2780 بود. در حالی که، میزان بیان پروتئین گانکیرین در رده سلولی A2780/RCIS، بیش‌تر از بیان این پروتئین در رده سلولی A2780 بود، ولی این افزایش بیان گانکیرین به صورت معنادار مشاهده نشد. از آن‌جاکه سلول مقاوم به داروی سیس پلاتین A2780/RCIS ترانسپورتر MRP2 را به میزان بسیار بیش‌تری از سلول والد بیان می‌کند، این نتایج پیشنهاد می‌کند که ارتباط معکوسی بین میزان بیان دو ژن MRP2 و گانکیرین وجود دارد. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که کاهش میزان بیان گانکیرین باعث افزایش حساسیت رده سلولی SGC7901/VCR (سلول آدنوکارسینومای معده مقاوم به وین کریستین) به داروهای ضدسرطان می‌شود و هم‌چنین توانایی این سلول‌ها را در صدور آدریامایسین به خارج از سلول کاهش می دهد. آن‌ها نشان دادند که بیان ژن P28GANK باعث کاهش بیان MDR1 شد، در حالی که اثری روی میزان بیان MRP نداشت(۲۵).

نتایج این تحقیق نشان دادند که میزان بیان گانکیرین در رده‌های سلولی EPG85-257/RDB در سطح mRNA و پروتئین، کم‌تر از میزان بیان آن در رده‌های سلولی والد حساس به داروی آن‌ها (EPG85-257) می باشد. از آن جا که سلول های مقاوم به داروی دوکسوروبیسین (EPG85-257/RDB) و آدریامایسین (MCF7/ADR) ترانسپورتر MDR1 را به میزان بسیار بیش تری از سلول والد بیان می‌کند، این نتایج پیشنهاد می‌کند که ارتباط معکوسی بین میزان بیان دو ژن MDR1 و گانکیرین وجود دارد. محققان در مطالعه دیگری به بررسی مکانیسم اثر گانکیرین در کاهش مقاومت دارویی در سلول‌های استئوکارسینوما پرداختند. آن‌ها مشاهده کردند که افزایش بیان گانکیرین در سلول مقاوم به سیس پلاتین Saos2/CDDP نسبت به سلول‌های والد حساس به دارو وجود دارد. هم‌چنین القای بیان گانکیرین در سلول‌های Saos2 باعث بروز مقاومت آن‌ها به داروهای وابسته و غیروابسته به MDR1 می‌شد و در جهت مقابل، مهار بیان گانکیرین در سلول‌های Saos2/CDDP باعث افزایش حساسیت آن‌ها به داروهای شیمی درمانی می‌شد. بیان ژن گانکیرین موجب مهار آپوپتوز القاء

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

شده توسط آدریامایسین و هم‌چنین کاهش میزان تجمع داخل سلولی آدریامایسین شد. در نهایت مشاهده شد که بیان ژن گانکیرین همراه با افزایش بیان ژن‌های MDR1 و Bcl2 و کاهش بیان Bax بود. در مجموع آن‌ها پیشنهاد کردند که کاهش بیان ژن گانکیرین باعث افزایش حساسیت سلول‌های استئوکارسینوما به داروهای شیمی درمانی از طریق کاهش بیان MDR1 و Bcl2 و افزایش بیان Bax می‌شود(۱۱).

در این مطالعه، در یک غربالگری اولیه به مقایسه میزان بیان پایه گانکیرین در سلول‌های مقاوم به دارو (که هر یک به عنوان مدلی از افزایش بیان MRP2 و MDR1 مطرح هستند) با سلول‌های والد حساس به دارو، پرداخته شد. نتایج نشان داد که بیان گانکیرین در رده‌های سلولی A2780/RCIS و EPG85-257/RDB نسبت به سلول والد کاهش یافته است. به طور خلاصه این نتایج برای اولین بار نشان داد که ارتباط معکوسی بین میزان بیان گانکیرین و بروز فنوتیپ مقاومت دارویی ناشی از افزایش بیان ترانسپورت‌های دارویی وجود دارد. لذا این فرضیه مطرح می‌شود که افزایش بیان ترانسپورترهای دارویی بیان و عملکرد برخی اونکوپروتئین‌ها را کاهش می‌دهند. این فرضیه می‌تواند انقلابی در دانسته‌های قبلی راجع به فنوتیپ مقاومت دارویی ایجاد کند، بدین شرح که افزایش بیان پمپ‌ها اگر چه باعث کاهش اثر دارو بر سلول توموری می‌شود، اما با مهار اونکوپروتئین‌ها می‌تواند فنوتیپ مهاجم و تومورزای سلول را مهار نماید و از پیشرفت سرطان جلوگیری کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد- مشهد- ایران به خاطر حمایت مالی برای از این پروژه (گرانت شماره ۹۱۰۹۹۰) تشکر می کنند. نتایج این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی سرکار خانم مریم طاهری در دوره کارشناسی ارشد بوده است.

References

1. Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. Cancer Cell Int 2005; 5: 30.
2. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. FEBS Letters 2006; 580(12): 2903-2909.
3. Palakurthi S, Yellepeddi VK, Vangara KK. Recent trends in cancer drug resistance reversal strategies using nanoparticles. Expert Opin Drug Deliv 2012; 9(3): 287-301.
4. Krzywda S, Brzozowski AM, Higashitsuji H, Fujita J, Welchman R, Dawson S, et al. The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors Rb and p53. J Biol Chem 2004; 279(2): 1541-1545.
5. Nakamura Y, Nakano K, Umehara T, Kimura M, Hayashizaki Y, Tanaka A, et al. Structure of the oncoprotein gankyrin in complex with S6 ATPase of the 26S proteasome. Structure 2007; 15(2): 179-189.
6. Qin JM, Fu XY, Li SJ, Liu SQ, Zeng JZ, Qiu XH, et al. Gene and protein expressions of p28GANK in rat with liver regeneration. World J Gastroenterol 2003; 9(11): 2523-2527.
7. Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo Y, et al. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. Cancer Cell 2005; 8(1): 75-87.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

8. Dawson S, Apcher S, Mee M, Higashitsuji H, Baker R, Uhle S, et al. Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26 S proteasome. J Biol Chem 2002; 277(13): 10893-10902.
9. Ying H, Xiao ZX. Targeting retinoblastoma protein for degradation by proteasomes. Cell Cycle 2006; 5(5): 506-508.
10. Hickman ES, Moroni MC, Helin K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. Curr Opin Genet Dev 2002; 12(1): 60-66.
11. Wang G, Rong J, Zhou Z, Duo J. Novel gene P28GANK confers multidrug resistance by modulating the expression of MDR-1, Bcl-2 and Bax in osteosarcoma cells. Mol Biol (Mosk) 2010; 44(6): 1010-1017.
12. Keshelava N, Zuo JJ, Waidyaratne NS, Triche TJ, Reynolds CP. p53 mutations and loss of p53 function confer multidrug resistance in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 2000; 35(6): 563-568.
13. Ortiz CM, Ito T, Tanaka E, Tsunoda S, Nagayama S, Sakai Y, et al. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. Int J Cancer 2008; 122(2): 325-332.
14. Horibe S, Nagai J, Yumoto R, Tawa R, Takano M. Accumulation and photodynamic activity of chlorin e6 in cisplatin-resistant human lung cancer cells. J Pharm Sci 2011; 100(7): 3010-3017.
15. Tanaka N, Kimura H, Faried A, Sakai M, Sano A, Inose T, et al. Quantitative analysis of cisplatin sensitivity of human esophageal squamous cancer cell lines using in-air micro-PIXE. Cancer Sci 2010; 101(6): 1487-1492.
16. Zhao X, Yang L, Hu J. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR 2011; 30(1): 55.
17. Kalalinia F, Elahian F, Hassani M, Kasaeeian J, Behravan J. Phorbol ester TPA modulates chemoresistance in the drug sensitive breast cancer cell line MCF-7 by inducing expression of drug efflux transporter ABCG2. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(6): 2979-2984.
18. Kalalinia F, Elahian F, Mosaffa F, Behravan J. Celecoxib Up Regulates the Expression of Drug Efflux Transporter ABCG2 in Breast Cancer Cell Lines. Iran J Pharm Res 2014; 13(4): 1393-1401 (Persian).
19. Tang S, Yang G, Meng Y, Du R, Li X, Fan R, et al. Overexpression of a novel gene gankyrin correlates with the malignant phenotype of colorectal cancer. Cancer Biol Ther 2010; 9(2): 88-95.
20. Lage H. Molecular analysis of therapy resistance in gastric cancer. Digestive diseases (Basel, Switzerland) 2003; 21(4): 326-338.
21. Ozols RF, O'Dwyer PJ, Hamilton TC. Clinical reversal of drug resistance in ovarian cancer. Gynecol Oncol 1993; 51(1): 90-96.
22. Yuan C, Li J, Mahajan A, Poi MJ, Byeon IJ, Tsai MD. Solution structure of the human oncogenic protein gankyrin containing seven ankyrin repeats and analysis of its structure--function relationship. Biochemistry 2004; 43(38): 12152-12161.
23. Lozano G, Zambetti GP. Gankyrin: an intriguing name for a novel regulator of p53 and RB. Cancer Cell 2005; 8(1): 3-4.
24. Chen X, Zhang M, Liu LX. The overexpression of multidrug resistance-associated proteins and gankyrin contribute to arsenic trioxide resistance in liver and

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]

gastric cancer cells. Oncology Reports 2009; 22(1): 73-80.

25. Li X, Zhang Y, Xiong C, Jin H, Jing B, Zhang Y, et al. Overexpression of a new gene P28GANK confers multidrug resistance of gastric cancer cells. Cancer Invest 2009; 27(2): 129-139.
26. Man JH, Liang B, Gu YX, Zhou T, Li AL, Li T, et al. Gankyrin plays an essential role in Ras-induced tumorigenesis through regulation of the RhoA/ROCK pathway in mammalian cells. J Clin Invest 2010; 120(8): 2829-2841.
27. Meng Y, He L, Guo X, Tang S, Zhao X, Du R, et al. Gankyrin promotes the proliferation of human pancreatic cancer. Cancer Lett 2010; 297(1): 9-17.
28. Li J, Knobloch TJ, Kresty LA, Zhang Z, Lang JC, Schuller DE, et al. Gankyrin, a biomarker for epithelial carcinogenesis, is overexpressed in human oral cancer. Anticancer Res 2011; 31(9): 2683-2692.
29. Kim YH, Kim JH, Choi YW, Lim SK, Yim H, Kang SY, et al. Gankyrin is frequently overexpressed in breast cancer and is associated with ErbB2 expression. Exp Mol Pathol 2013; 94(2): 360-365.
30. Song X, Wang J, Zheng T, Song R, Liang Y, Bhatta N, et al. LBH589 Inhibits proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via inhibition of gankyrin/STAT3/Akt pathway. Mol Cancer 2013; 12(1): 114.
31. Zhang J, Yang Y, Zhang Z, He Y, Liu Z, Yu Y, et al. Gankyrin plays an essential role in estrogen-driven and GPR30-mediated endometrial carcinoma cell proliferation via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. Cancer Lett 2013; 339(2): 279-287.
32. Gao L, Xie H, Dong L, Zou J, Fu J, Gao X, et al. Gankyrin is essential for hypoxia enhanced metastatic potential in breast cancer cells. Mol Med Rep 2014; 9(3): 1032-1036.
33. Liu Y, Zhang J, Qian W, Dong Y, Yang Y, Liu Z, et al. Gankyrin is frequently overexpressed in cervical high grade disease and is associated with cervical carcinogenesis and metastasis. PloS One 2014;9(4): e95043.
34. Sakurai T, Yada N, Hagiwara S, Arizumi T, Minaga K, Kamata K, et al. Gankyrin induces STAT3 activation in tumor microenvironment and sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci 2017; 108(10): 1996-2003
35. Zeng YC, Sun D, Li WH, Zhao J, Xin Y. Gankyrin promotes the proliferation of gastric cancer and is associated with chemosensitivity. Tumour Biol 2017; 39(6): 1010428317704820.
36. Scanlon KJ, Kashani-Sabet M. Elevated expression of thymidylate synthase cycle genes in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma A2780 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(3): 650-653.
37. Aird RE, Cummings J, Ritchie AA, Muir M, Morris RE, Chen H, et al. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. Br J Cancer 2002; 86(10): 1652-1657.
38. Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. Cancer Res 2000; 60(7): 1789-1792.
39. Lage H, Jordan A, Scholz R, Dietel M. Thermosensitivity of multidrug-resistant human gastric and pancreatic carcinoma cells. Int J Hyperthermia 2000; 16(4): 291-303.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-17]