Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 37, No. 2, Jun. – Jul. 2015, Pages: 16-21

Effect of Resveratrol on the Expression of MDR1 Gene in MOLT-4 Leukemic Cell Line

Abbas Ali Hosein Poor Feyzi[1], Majid Farshdousti Hagh[2*], Tohid Ebadi[2], Ali Akbar Movasag Poor Akbari[2], Karim Shams Asanjan[2], Mehdi Talebi[2], Tagi Khanzadeh[2], Bahman Yusefi[3]

[1]Hematology & Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of hematology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Department of Biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

Received: 21 Jul, 2014 Accepted: 31 Aug, 2014

Abstract

Background and Objectives: The multi-drug resistance phenomena can limit the effect of chemotherapy and lead to the recurrence of leukemia. One of the main mechanisms of multi drug resistance is the increased expression of MDR1 gene that codes P-gp, a transmembrane carrier that exports drugs out of the leukemic cells. The aim of this study was to explore the effect of resveratrol, a natural compound, on the expression of MDR1 gene in leukemic cell line MOLT-4.

Material and Methods: MTT (Methyl Tiazol Tetrazolium) assay was used to determine the subtoxic doses of resveratrol for treatment of leukemic cells line real Time PCR was used to determine the expression of MDR1 gene. MOLT-4 cell line resistance was assessed after MTT implementation.

Results: Resveratrol could not suppress the growth of MOLT-4 cells. Genetic studies revealed increased expression of MDR1 gene. Resistance of MOLT-4 cells to vincristine was increased after coadministration of vincristine and resveratrol.

Conclusion: we did not find evidence that resveratrol can reverse multi drug resistance in MOLT-4 cells.

Keywords: Resveratrol, MDR1, P-g

*Corresponding author:
E-mail: M.farshdousti@gmail.com

تاثیر رزوراترول بر بیان ژن MDR1 در رده سلولی لوسمیک MOLT-4

عباسعلی حسین پور فیضی[۱]، مجید فرش دوستی حق[۲*]، توحید عبادی[۲]، علی اکبر موثق پور اکبری[۲]، کریم شمس اسنجان[۲]، مهدی طالبی[۲]، تقی خانزاده[۲]، بهمن یوسفی[۳]

[۱]مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]بخش هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۳/۴/۳۰ پذیرش: ۹۳/۶/۹

چکیده

زمینه و اهداف: در درمان لوسمی ها شیمی درمانی نقش عمده ای دارد با اینحال بروز پدیده مقاومت چند دارویی سبب کاهش اثر بخشی درمان و عود مجدد بیماری می شود. یکی از علل اصلی بروز پدیده مقاومت چند دارویی، افزایش بیان ژن MDR1 می باشد که پروتئین حامل غشایی P-gp را کد می کند که سبب تخلیه داروها به بیرون از سلول لوسمیک شده و بدین ترتیب سبب مقاومت سلول می شود. لذا کاهش بیان ژن MDR1 می تواند سبب کاهش مقاومت دارویی شود. بر این اساس هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر ماده گیاهی رزوراترول بر بیان ژن MDR1در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد MOLT-4می باشد.

مواد و روش‌ها: رده سلولی MOLT-4 از بانک سلولی پاستور ایران تهیه شد. سلول ها در محیط کشت RPMI 1640 کشت داده شدند. سیتوتوکسیسیتی رزوراترول نسبت به سلول های MOLT-4 با استفاده از MTT تعیین شد. سلول های MOLT-4 و نیز لنفوبلاست های استخراج شده از خون محیطی بیماران با محلول رزوراترول تیمار شدند سپس RNA توتال استخراج شده و تغییر بیان ژن MDR1 با استفاده از Real Time PCR ارزیابی شد. تغییر مقاومت سلول ها نسبت به وینکریستین در همراهی با رزوراترول بررسی شد.

یافته‌ها: رزوراترول سبب مهار رشد سلول های MOLT-4 نشد. بیان ژن MDR1 متعاقب تیمار سلولی با رزوراترول بصورت وابسته به دوز و زمان افزایش داشت. مقاومت سلول های MOLT-4 نسبت به وینکریستین در همراهی با رزوراترول افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: شواهدی در حمایت از داروی گیاهی رزوراترول به عنوان کاهش دهنده مقاومت چند دارویی پیدا نکردیم.

کلید واژه‌ها: رزوراترول، MDR1، P گلیکوپروتئین

*ایمیل نویسنده رابط: M.farshdousti@gmail.com

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد شایعترین بدخیمی در کودکان بوده و ۲۰ درصد از لوسمی‌های بزرگسالان را نیز شامل می شود (۱). در درمان لوسمی‌ها شیمی درمانی نقش عمده‌ای دارد اما مقاومت بعضی از سلول‌های سرطانی سبب کاهش اثربخشی داروهای شیمی درمانی می‌شود. به عبارت دیگر بعضی سلول های سرطانی در برابر داروهای شیمی درمانی استفاده شده مقاومت کسب می-کنند و حتی در برابر داروهای شیمی درمانی که عملکرد و ساختار متفاوت دارند نیز مقاومت کسب می‌کنند که از این پدیده با عنوان مقاومت چند دارویی یاد می‌شود (۲). در بین عوامل اصلی ایجاد کننده مقاومت چند دارویی، افزایش بیان ژن MDR1 از اهمیت بالایی برخوردار است. این ژن پروتئین غشایی P-glycoprotein را کد می‌کند که مولکولی با وزن ۱۷۰ کیلو دالتون و متصل شونده به ATP می‌باشد (۳). P-gp به طور طبیعی در غشای بسیاری از سلول‌ها وجود دارد و در تخلیه داروها و مواد سمی به بیرون از سلول نقش دارد اما افزایش بیان آن در طی پروسه شیمی درمانی در سلول‌های لوسمیک سبب بروز پدیده مقاومت چند دارویی می شود (۴و۵). لذا با کاهش بیان آن می‌توان مقاومت چند دارویی را کاهش داد. یک سری مواد سنتتیک برای مهار مقاومت چند دارویی و به عبارتی بهتر برای کاهش عملکرد محصول ژن MDR1 (P-gp) در محیط آزمایشگاه و یا در محیط زنده آزمایش شده‌اند که یا از عملکرد مطلوب برخوردار نبوده اند ویا در غلظت های موءثر در آزمایشگاه، قابل تحمل در محیط زنده به دلیل عوارض جانبی، نبوده اند. از جمله این مواد می‌توان به وراپامیل اشاره کرد که در دوز های موءثر در مهار عملکرد P-gp، بدلیل عوارض جانبی قابل

استفاده نیست (۷و۶). در این میان استفاده از مواد طبیعی در مهار پدیده مقاومت دارویی به دلیل عوارض جانبی کم، می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد. رزوراترول ماده‌ای طبیعی می‌باشد که در ریشه گیاه Polygonum و نیز یکسری میوه‌ها به ویژه پوسته انگور موجود می‌باشد. رزوراترول در طب سنتی آسیای جنوب شرقی با نام Ko-Jo-Kon و به عنوان ضد التهاب شناخته می‌شود (۸). با این حال استفاده از رزوراترول در زمینه مهار مقاومت چند دارویی به سال های اخیر بر می‌گردد. رزوراترول یک فیتوآلکسین می‌باشد که از گیاهان در برابر قارچ‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌ها و نور ماوراء بنفش محافظت می‌کند. پوست میوه انگور به ویژه انگور قرمز حاوی مقادیر بالایی از رزوراترول می‌باشد (۹). این ماده طبیعی اثر وابسته به دوز بر روی فعالیت آپوپتوزی و میتوزی رده-های سلولی اندوتلیالی و نیز توموری داشته است طوریکه در دوزهای پایین سبب افزایش تقسیم سلولی می شود درحالیکه دوزهای بالاتر سبب القای آپوپتوز و کاهش فعالیت میتوزی شده است (۱۰). همچنین برای رزوراترول اثرات ضد التهابی (مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز) و آنتی اکسیدانی و مهارکننده رشد سلولی گزارش شده است (۱۱). با توجه مقدمه مذکور، هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر رزوراترول بر بیان ژن MDR1 در رده سلولی MOLT-4 می‌باشد که رده سلولی از نوع T-ALL می باشد که در فاز عود مجدد بیماری بدنبال شیمی درمانی تهیه شده است.

مواد و روش‌ها

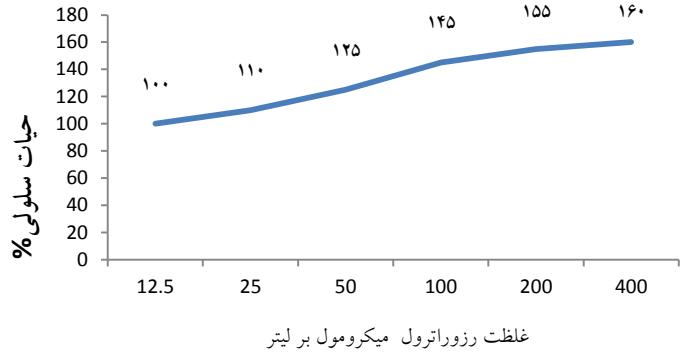
در این مطالعه، رده سلولی MOLT-4 از بانک سلولی پاستور ایران تهیه شد. پودر محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از Gibco, Invitrogen, USA و پودر رزوراترول از شرکت NaturaBio, USA خرید شدند. پنی سیلین استرپتومایسین و پودر MTT مارک سیگما، آلمان تهیه شدند. کیت سنتز cDNA و SYBR Green Real Time PCR از شرکت Bioneer و محلول استخراج توتال RNA از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند. برای انجام Real Time PCR از دستگاه Eco illumine استفاده شد. تمامی مراحل کشت سلولی تحت شرایط استریل و زیر هود لومینار انجام شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 غنی‌شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پنی سیلین استرپتومایسین کشت داده شدند و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. سلول‌ها در مراحل بعدی در پلیت های ۹۶ و ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. سیتوتوکسیسیتی رزوراترول نسبت به سلول‌های MOLT-4 در محیط آزمایشگاه با استفاده از روش رنگ سنجی MTT و پلیت ۹۶ خانه‌ای ارزیابی شد بدین ترتیب که به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای تعداد ۲۰ هزار سلول در قالب ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت افزوده شد. بعد از یک شبانه روز انکوباسیون پلیت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2، ۵۰ میکرولیتر محلول رزوراترول با غلظت های مختلف به چاهک ها اضافه شده و پلیت برای ۴۸ ساعت دیگر در ۳۷ درجه با ۵ درصد CO2 انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت یک گرم بر لیتر به هر چاهک اضافه شده و پلیت به مدت ۴ ساعت دیگر در ۳۷ درجه انکوبه شد. در ادامه پلیت سانتریفیوژ شده و مایع رویی چاهک ها برداشته شده و به چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده و پلیت بر روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه و در شرایط تاریکی قرار داده شد سپس بلافاصله جذب نوری چاهک ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر در الایزا ریدر قرائت شد. آزمایش‌ها بصورت دوتایی انجام شدند. میزان فعالیت و زنده بودن سلول ها (Viability) تعیین شد. سلول-های MOLT-4 در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شده سپس غلظت‌های ۱۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر رزوراترول به پلیت های ۶ خانه‌ای A, B, C اضافه شد. پلیت ۶ خانه‌ای D به عنوان کنترل بوده و رزوراترول اضافه نشد. هر چهار پلیت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO2 انکوبه شدند. بعد از ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت، از هرکدام از پلیت‌ها مقداری سلول برداشته و توتال RNA با استفاده از محلول گوآنیدیوم ایزوتیوسیانات و فنول کلروفرم استخراج شد. RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA به رشته DNA تبدیل شد. در ادامه میزان بیان ژن MDR1 با استفاده از پرایمرهای مربوطه و روش Real Time PCR ارزیابی شد. بیان ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده بدین ترتیب می باشد:

MDR1(87bp) sense 5´-CGGGAGCAGTCATCTGTGGT-3´
´antisense 5´-CAAAGAGAGCGAAGCGGCTG-3
β-actin (160 bp) sense 5´-AGA ACA TCA TCC ATG ´CAT CCA-3
´antisense 5´-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3

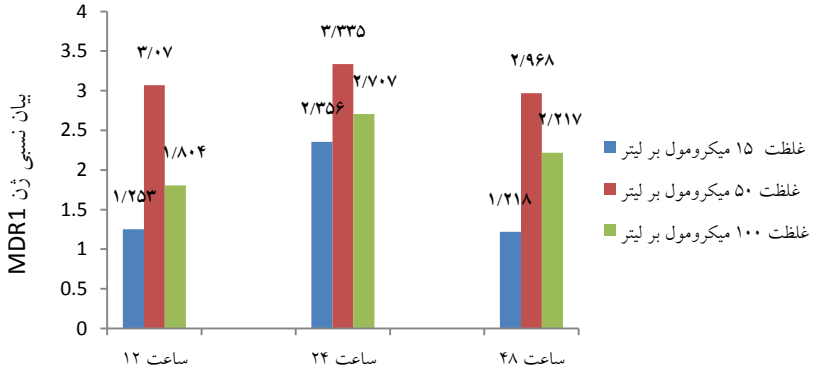
مراحل Real Time PCR به ترتیب زیر می باشد:
ابتدا ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۵ چرخه: ۹۴ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه (ژن MDR1) و ۶۰ درجه (بتا اکتین)، ۷۲ درجه بمدت ۳۵ ثانیه.
از خون محیطی ۵ مورد بیمار New case ALL با استفاده از فایکول و سانتریفیوژ، لنفوبلاست های لوسمیک جدا شده و با غلظت ۵۰ میکرومول بر لیتر رزوراترول به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده و میزان تغییر بیان ژن MDR1 با روش Real Time PCR ارزیابی شد.
تغییر مقاومت سلول های MOLT-4 نسبت به وینکریستین در همراهی با رزوراترول در قالب تست MTT ارزیابی شد. از وراپامیل به عنوان کنترل استفاده شد. در این مورد از شاخص IC50 استفاده شد که درواقع غلظتی از دارو می‌باشد که سبب کاهش حیات سلولی تا ۵۰ درصد می شود. تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۳ و برنامه ANOVA مورد آنالیز قرار گرفتند. $P<0.05$ در نظر گرفته شد. از تست MTT برای بررسی سیتوتوکسیسیتی رزوراترول بر روی سلول های MOLT-4 استفاده شد و حیات سلولی (Viability) تعیین شد. نتایج این تست نشانگر آن بود که غلظت های متغیر رزوراترول (از ۱۲/۵ تا ۴۰۰ میکرومول بر لیتر) اثر مهاری بر رشد سلول‌های MOLT-4 نداشتند (نمودار ۱). در مراحل بعدی برای بررسی تغییر بیان ژن MDR1 از Real Time PCR استفاده شد و نتایج حاصله حاکی از افزایش بیان

معنادار ژن MDR1 بویژه در غلظت ۵۰ میکرومول بر لیتر رزوراترول و زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با سلول های کنترل می باشد. لذا نتایج ارزیابی تغییر بیان ژن MDR1 نشانگر تاثیر وابسته به دوز و وابسته به زمان رزوراترول می‌باشد (نمودار ۲). از طرف دیگر بیان ژن MDR1 در لنفوبلاست های ۴ بیمار تغییر معناداری را متعاقب تیمار سلولی با رزوراترول در محیط آزمایشگاه نشان نداد و حتی در بیمار پنجم، افزایش بیان را نشان داد (نمودار ۳).

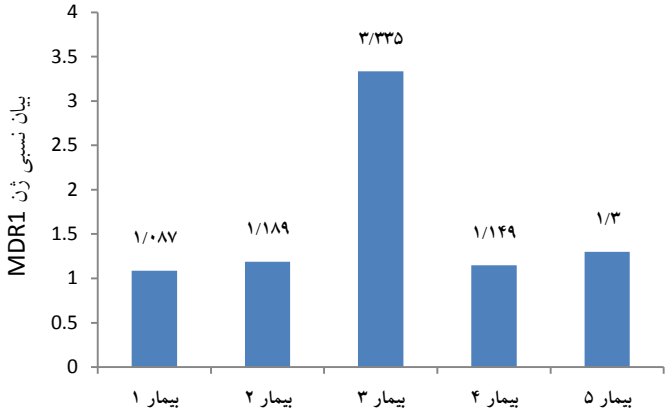
تغییر مقاومت سلول های MOLT-4 نسبت به وینکریستین در همراهی با رزوراترول در قالب تست MTT و شاخص IC50 ارزیابی شد که نتایج مربوطه حاکی از افزایش IC50 از ۶۲ نانومول بر لیتر به ۱۲۵ نانومول بر لیتر می‌باشد به عبارت دیگر مقاومت سلول های MOLT-4 نسبت به وینکریستین در همراهی با رزوراترول افزایش داشته است (نمودار ۴).



نمودار ۱: بررسی سیتوتوکسیسیتی رزوراترول بر روی سلول های MOLT-4 با تست MTT



نمودار ۲: تاثیر رزوراترول بر بیان ژن MDR1 در رده سلولی MOLT-4



نمودار ۳: بیان نسبی ژن MDR1 در لنفوبلاست های بیماران ALL متعاقب تیمار سلولی در آزمایشگاه

نمودار ٤: تاثیر رزوراترول بر تغییر مقاومت سلول های MOLT-4 نسبت به وینکریستین

بحث

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) بدخیمی سلول های سفید بوده که با افزایش بیش از حد لنفوبلاست های بدخیم در مغز استخوان و انتشار آن به خون محیطی و سایر ارگان ها مشخص می شود. این بیماری در صورت عدم درمان در عرض چند هفته کشنده است. در درمان لوسمی‌ها شیمی درمانی جایگاه عمده ای دارد اما کسب مقاومت دارویی توسط سلول های بدخیم در طی پروسه درمان سبب شکست درمان و عود مجدد بیماری می شود. افزایش بیان ژن‌های خانواده ABC به ویژه ABCB1 (یا MDR1) از عوامل اصلی پدیده مقاومت چند دارویی هستند. لذا کاهش بیان ژن MDR1 می‌تواند سبب مهار مقاومت چند دارویی شود. رزوراترول، ماده طبیعی استفاده شده در این مطالعه، در پیشگیری از بیماری‌های قلبی نقش دارد و نقش آنتی اکسیدانی و ضد التهابی هم برای آن گزارش شده است. در مطالعه‌ای Bela و همکاران نشان دادند که رزوراترول تاثیر وابسته به دوز بر روی فعالیت میتوزی و آپوپتوزی سلوهای اندوتلیالی و رده های سلولی چون رده کولون کارسینومای انسانی HT-29، SW-620، فیبروسارکومای انسانی HT-1080 دارد (۱۰). Fang G و همکاران تاثیر رزوراترول بر بیان ژن MDR1 را در رده سلولی اپیدرموئیدی KBv200 بررسی کرده و نشان دادند که رزوراترول در دوزهای مورد استفاده سبب کاهش بیان ژن MDR1 شده است. اما نتایج مطالعه حاضر نشانگر آن است که دوزهای متغیر مورد استفاده در این مطالعه، اثر مهاری بر رشد رده سلولی لوسمیک MOLT-4 نداشت. همچنین بیان ژن MDR1در رده سلولی MOLT-4 به دنبال تیمار سلولی با رزوراترول، افزایش بیان داشته است. از طرف دیگر بیان ژن MDR1 در لنفوبلاست‌های بیماران متعاقب تیمار سلولی با رزوراترول در محیط آزمایشگاه، کاهش بیان را نشان نداد. همچنین نتایج مطالعه تغییر مقاومت نسبت به وینکریستین در صورت همراهی با رزوراترول، نشانگر افزایش شاخص IC50 بود به عبارت دیگر رزوراترول سبب تشدید مقاومت سلول‌های MOLT-4 نسبت به وینکریستین شده است. از طرف دیگر در مطالعه‌ای پیشرفته تر و جامع تر، Susan و همکاران برای مطالعه اثرات رزوراترول در شرایط in vivo، رده سلولی ALLt(4;11) نوع B با عنوان SEM که بعلت قابلیت بالا در کسب مقاومت دارویی و سرعت تهاجم بالا از پیش آگهی ضعیفی برخوردار است، را به موش‌های NOD/SCID که رزوراترول را به صورت خوراکی تجویز می‌شدند، تزریق کردند و تعداد سلولهای سرطانی را با فلوسیتومتری CD19 ارزیابی کردند که همچنان در حال افزایش بود و خبر از ناکارآمدی رزوراترول در مهار رشد و تکثیر سلولهای سرطانی بود. در ادامه به همین موش‌ها وینکریستین تزریق کردند که نتیجه ارزیابی با گروه کنترل تفاوتی نداشت به عبارت دیگر هم در موش‌هایی که رزوراترول دریافت می‌کردند و هم در موش-هایی که رزوراترول دریافت نمی‌کردند، سلول‌های سرطانی به وینکریستین مقاوم بوده و درحال تکثیر و افزایش بودند (۱۲) و بطور خلاصه مطالعه ایشان شواهدی در حمایت از رزوراترول در کنترل سرطان مطرح نکرد و این نتیجه همسو با نتایج مطالعه حاضر می باشد.

نتیجه‌گیری

شواهدی در حمایت از داروی گیاهی رزوراترول به عنوان کاهش‌دهنده مقاومت دارویی در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد یافت نشد.

تقدیر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استخراج شده است و از این مرکز به خاطر حمایت مالی و از همسرم بخاطر همکاری در ویراستاری این مقاله و خانم مجیدی، سرپرستار بخش خون بیمارستان کودکان تبریز به خاطر همکاری در تهیه نمونه‌های بیماران قدردانی می‌شود.

References

1. Miladpoor B, Behravan J, Mosaffa F, Nejatshokouhi A, Mohammad H. Evaluation of C3435T MDR1 Gene Polymorphism in adult Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Medicine* 2011; **12**: 3-6.

2. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Toxico, Annu Rev Pharmacol* 1999; **39**: 361-398.
3. Mohammadzadeh R, Baradaran B, Valizadeh H, Yoosefi B, Zakeri-Milani P. Reduced ABCB1 Expression And Activity In The Presence Of Acrylic Copolymers. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2014, x(x).
4. Cheol-Hee Choi. ABC transporters as multi drug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for the irreversal. *Cancer Cell Int* 2005; **5**: 30.
5. Teodori E, Dei S, Martelli C, Scapecchi S, Gualtieri F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of P-glycoprotein and MRP1 to control multi drug resistance(MDR). *Curr Drug Targets* 2006; **7**: 893-909.
6. Kitagawa Susumu. Inhibitory effects of polyphenols on P-glycoprotein-mediated transport. *Biol Pharm Bull* 2006; **29**: 1-6.
7. Borowski Eric, Bontemps-Gracz Maria,Piwkowska Anna.Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multi drug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol* 2005; **52**: 609-627.
8. Jean Francois Savouret, Michel Quesne. Resveratrol and cancer: a review. *Biomed Pharmacother* 2002; **56**. 84-87.
9. Siemann Evan, Creasy Lau. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* 1992; **43**: 49-52.
10. Bela Sheho, Erno Tornikoski, Zsuzsa Kirsch. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Experimental and Molecular Medicine* 2000; **32**: 88-92.
11. Athar Mohammad, Jungho Kim, Xiuwei Tu. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; **224:** 274-283.
12. Susan Jane, Zunino, David Henrie. Dietary resveratrol does not delay engraftment, sensitise to vincristine or inhibit growth of high-risk acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice. *International Journal of Oncology* 2012; **41**: 2207-2212.