مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۸، شماره ۳، مرداد و شهریور۱۴۰۲(شماره پی در پی ۱۵۸)

بررسی بیان ژن‌های SMAD3 وSMAD4 در بیماران مبتلا به CML و رده سلولی K562

طوبی مهدلو، حامدرضا گودرزی*، مجتبی جعفری نیا

[1]گروه زیست شناسی ـ ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی میلوییدی مزمن یا CML یک اختلال میلوپرولیفراتیو کلونال با شاخص سیتوژنتیکی کروموزوم غیر طبیعی فیلادلفیا می‌باشد. یکی از مسیرهای پیام رسانی مهم در روند تکثیر و آپوپتوز سلول‌های سرطانی و پاتوژنز بیماری TGF-β می‌باشد که عدم تنظیم بیان اجزای آن مانند خانواده SMADها نقش به سزایی در تنظیم رشد تومور و توسعه سرطان ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی بیان ژن‌های SMAD3 وSMAD4 در بیماران مبتلا به CML و رده سلولی K562 بود.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی به صورت مورد ـ شاهدی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انجام شد. جامعه آماری پژوهش شامل ۸۰ نفر مراجعه کننده به پیوند می‌باشند که در دو گروه ؛ ۴۰ بیمار مبتلا به CML به عنوان گروه مورد و ۴۰ فرد سالم به عنوان کنترل که از نظر سن و جنس سازگار بودند و رده سلولی K562 انتخاب شدند. میزان بیان ژن‌های SMAD3 وSMAD4 به وسیله تکنیک Real Time PCR و سنتز cDNA سنجیده شد و داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری T test آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ژن SMAD3دربیماران مبتلا به CML به طور معنا داری دچار کاهش بیان بود و این نتیجه در رده سلولی K562 نیز مشاهده گردید($p<0.0001$)و میزان بیان ژن SMAD4 در بیماران و رده سلولی K562 هیچگونه ارتباط معناداری با بیماری را نشان نداد($p<0.001$) مقادیر P کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد).

نتیجه‌گیری: بر طبق مطالعه انجام شده بیان برخی ژن‌ها در مسیرهای پیام رسانی می‌تواند نقش مؤثری در توسعه بیماری یا مقاومت دارویی داشته باشد. کاهش بیان SMAD3 در CML می‌تواند نشان دهنده ارتباط بیماری و اختلال در بیان ژن‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی میلوییدی مزمن، TGF-β، SMAD3، SMAD4

***نویسنده مسئول: حامدرضا گودرزی،** مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، گروه زیست شناسی ـ ژنتیک

Email: tmahdloo@yahoo.com

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

مقدمه

سرطان یکی از شایع‌ترین و دشوارترین بیماری‌هایی می‌باشد که علم پزشکی با آن رو به رو شده است. آمارها نشان دهنده این است که ۲۰ درصد مرگ و میرها بر اثر سرطان می‌باشد(۱).

لوسمی میلوئید مزمن یا (CML)[1] یک اختلال میلوپرولیفراتیو کلونال است که از سلول‌های بنیادی پیشساز خونی و بر اثر جهش به وجود می‌آیند(۲)، دلیل مهم بروز CML وجود یک کروموزوم کوچک غیر نرمال در سلول‌های توموری بیماران است و بیماری شامل؛ فازهای مزمن[2]، تسریع شده[3] و بلاستیک[4] می‌باشد(۳).

کروموزوم غیر طبیعی فیلادلفیا در نتیجه یک جا به جایی متقابل بین کروموزوم ۹ وکروموزوم ۲۲ می‌باشد. بعدها، نشان داده شد که بخش از ژن ابلسون در کروموزوم ۹ یعنی ABL با ناحیه‌ای از ژن BCRبر روی کروموزوم ۲۲ جا به جا شده و BCR-ABLایجاد شده است که یک انکوژن هیبرید و کد کننده پروتئین فیوژن BCR-ABL است(۴). BCR-ABL از لحاظ ساختاری، تیروزین کیناز را فعال کرده و منجر به اختلال در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ پایین دستی شده و باعث افزایش تکثیر و بقاء سلول‌های لوکمیک می‌شود. کشف BCR-ABL نقطه عطف کلیدی در شناخت CML بود و در تدابیر درمانی هدفمند دارای اهمیت بسیاری زیادی است(۵).

در بیش از ۹۵ درصد موارد حضور کروموزوم فیلادلفیا، شاخص سیتوژنتیک CML است. کرورموزوم فیلادلفیا در همه دودمان‌های سلول میلوئیدی از جمله اریتروسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، مگاکاریوسیت‌ها و همچنین برخی از سلول‌های دودمان لنفوسیتی وجود دارد و این نشانه آن است که ترانسفورماسیون بدخیم به CML از سطح سلول های بنیادی ناشی می‌شود(۶).

مسیرهای پیام رسانی مانند؛ Alox5، Sonic hedgehog، JAK/STAT و TGF- βبه منظور درک چگونگی مانایی و عملکرد سلول‌های بنیادی CML و پیدا کردن مسیرهای پیام رسانی‌ای که در صورت مهارشدن، منجر به ریشه کن شدن سلول‌های بنیادی CML یا حساس کردن آنها به مهار کننده های تیروزین کیناز[5] یا سایر داروهای آنتی لوکمی شود، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(۷ و۴).

از آن جا که از تنظیم خارج شدن فعالیت مسیر سیگنال دهی TGF-β یکی از عوامل پاتوژنز بیماری و مقاومت درمانی لوکمیک استم سل‌ها است، به نظر می‌رسد هدف‌گیری این مسیر می‌تواند استراتژی درمانی بالقوه‌ای برای توسعه درمان‌های هدفمند بر علیه CML باشد(۹ و۸).

مسیر پیام رسا نی TGF-β یک فرآیند تنظیمی ضروری برای فعالیت‌های سلولی شامل؛ تکثیر، تمایز و بقا می‌باشد. در طی فرآیند خون‌سازی مسیر پیام رسانی TGF-β یک عامل تنظیمی بالقوه در تمایز و

1-Chronic Myeloid Leukemia
2-Chronic
3-Accelerated
4-Blast
5-Tyrosin Kinase Inhibitor (TKI)

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]
[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

تکثیر سلول‌ها می‌باشد(۱۰). در بدخیمی‌های هماتولوژیکی شامل لوکمی اختلالات میلوپرولیفراتیو لنفوما و مالتیپل میلوما مقاومت به تأثیرات هموستاتیک TGF-β گسترش می‌یابد. مکانیسم این مقاومت شامل جهش حذف برخی از اجزای خانواده TGF-β و یا تخریب مسیر پیام رسانی به وسیله انکوپروتین‌ها می‌باشد(۱۱). این تغییرات بیانگر نقش اساسی TGF-β در سرکوب تومورها است. هم‌چنین افزایش سطح TGF-β می‌تواند پیش برنده میلوفیبروزیس و بیماری‌زایی برخی بدخیمی‌های هماتولوژیکی به وسیله اثراتش بر استروما و سیستم ایمنی باشد(۱۲).

TGF-β در پستانداران به صورت سه ایزوفرم tgf-b1 tgf-b2 , tgf-b3 وجود دارد که بتا ۱ از فراوانی بسیار بالایی برخوردار است و پژوهش‌های متعددی نیز بر روی آن انجام شده است(۱۳). گیرنده tgf-b1 فعال شده و باعث فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی مانند Smad2/3 و سپس اتصال آنها به Smad4 می‌شود و در هسته جایگیری می‌شوند و با برهمکنش با دیگر فاکتورهای رونویسی مانند کو اکتیویتورها و کورپرسورها، فرایند های رونویسی ژن‌های تحت تأثیر مسیر پیام رسانی TGF-β را تنظیم می‌کنند(۱۴).

smad ها یک دسته از پروتئین‌ها می‌باشند که نقش و عملکرد آنها به عنوان فاکتورهای تأثیرگذار در مسیر پیام رسانی داخل سلولی در ابر خانواده TGF-β می‌باشد(۱۵).

Smad ها می توانند یه سه زیر گروه مجزا تقسیم شوند که شامل smad فعال شونده از طریق گیرنده یا R-smad smads همراه یا co-smad و smads مهاری یاanti- smad می باشد (۱۶).

smad2 /3 جزو دسته R-smad ها می باشند که وظیفه انتقال سیگنال های فعال کننده TGF-β را بر عهده دارند، در حالی کهsmad1/5/8 که اجزای دیگر R-samd ها می باشند سیگنال های (BMP)[1] را واسطه‌گری می‌کنند. smad4 تنها co-smad شناسایی شده در پستانداران می‌باشد(۱۶). [2]

پروتئین SMAD3 به وسیله ی ژن SMAD3 کد می‌شود و تکثیر سلولی و تمایز و مرگ سلولی را تنظیم می کند. نقش اساسی آن از طریق TGF-β با رشد تومور در توسعه ی سرطان مرتبط است(۱۷).

بیان ژن این پروتئین با مسیر سیگنال دهی (MAPK/ERK)[2] مخصوصاً با فعالیت (MEK-1)[3] در ارتباط است.

مطالعات نشان می‌دهد که مهار MEK-1 باعث کاهش بیان SMAD3 می شود.

SMAD3 یک تعدیل کننده رونویسی است و با اتصال به (TRE)[4] در ناحیه پروموتر بسیاری از ژن‌ها که به وسیله TGF-β تنظیم می‌شوند، این عملکرد خود را ایفا می‌کند. هم‌چنین SMAD3 و SMAD4 با اتصال به c-Fos و c-jun در محل AP-1/SMAD تشکیل کمپلکس می‌دهند

1-Bone Morphogenetic Protein
2-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK/ERK)
3-Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase-1(MEK-1)
4-TPA Responsive Element

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]
[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

و باعث تنظیم القای رونویسی از TGF-β می‌شوند(۱۸). ژن‌هایی که به وسیله SMAD3 و TGF-B تنظیم می‌شوند، روی تمایز، رشد و مرگ سلولی اثر می‌گذارند. مسیرSMAD/ TGF-β نقش بسیار حیاتی در بیان ژن‌های کنترل کننده تمایز در سلول‌های بنیادی جنینی دارد. برخی از ژن‌های تنظیم شده به واسطه این مسیر شامل (FGF1)[۱]،(NGF)[۲] و WNT11 با سلول‌های بنیادی CD34 و CXCR4 مرتبط است(۱۹). از طرف دیگر زمانی که فعالیت TGF-β باعث تنظیم افزایشی ژن‌ها می‌شود، این مولکول باعث القای سرکوب بیان ژن‌های هدف TGF-β ، به واسطه عنصر بازدارنده β (TIE)-TGF می‌شود(۲۰).

SMAD3 هم‌چنین نقش کلیدی در القای سرکوب بیان ژن‌های هدف TGF-β، مخصوصاً در سرکوب ژن C-MYC دارد(۲۱).

پروتئین (SMAD4) جزء خانواده ی SMAD است. این پروتئین از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای با دیگر سلول‌ها و دیگر اعضای خانواده SMAD مانند SMAD2یا SMAD3 در ارتباط می‌باشد. SMAD4 با SMAD3 تشکیل یک کمپلکسی را می‌دهند که از این طریق می توانند به DNA متصل شده و بیان بسیاری از ژن‌ها که در تمایز و تکثیر سلولی نقش دارند را، تنظیم کنند(۲۳ و۲۲).

SMAD4 به عنوان یک میانجی‌گر، بین فاکتورهای رشد خارج سلولی خانواده ی TGF-β و ژن‌های داخل هسته می‌باشد. SMAD4 هم‌چنین به عنوان یک مبدل سیگنال[۳] تعریف شده است. در مسیر TGF-B، دایمر TGF-β به وسیله یک گیرنده گذرنده از غشاء[۴] که به رسپتور نوع ۲ شناخته شده است، شناسایی می‌شوند. زمانی که گیرنده‌های نوع ۲ به وسیله اتصال با TGF-β فعال می‌شوند، گیرنده‌های نوع ۱ که در سطح سلول هستند فسفریله می‌شوند(۲۴).سپس این گیرنده، گیرنده داخل سلولی R-SMAD مانند SMAD2 و SMAD3 فسفریله می‌کند. R-SMADهای فسفریله به SMAD4 متصل می‌شوند و تشکیل کمپلکس هترومریک می‌دهند که این کمپلکس می‌تواند از سیتوپلاسم به هسته حرکت کند. در هسته کمپلکس هترومریک به پروموترها اتصال می‌یابد واز این طریق با فعال کننده‌های رونویسی در ارتباط می‌باشد(۲۴). لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی بیان ژن‌های SMAD3 وSMAD4 در بیماران مبتلا به CML و رده سلولی K562 بود.[۳]

روش بررسی

این مطالعه، یک مطالعه توصیفی به صورت مورد ـ شاهدی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انجام شد. جامعه آماری پژوهش شامل ۸۰ نفر مراجعه کننده به آزمایشگاه پیوند می‌باشند که در دو گروه ؛ ۴۰ بیمار مبتلا به CML به عنوان گروه مورد و ۴۰ فرد سالم به عنوان کنترل که از نظر سن و جنس سازگار بودند و با رده

1-Fibroblast Growth Factor-1(FGF1)
2-Nerve Growth Factor (NGF)
3-Signal Transducer
4-Transmembrane Receptor

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]
[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

سلولی K562(انستیتو پاستور تهران)، انجام شد. ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری گردید. معیار انتخاب افراد سالم نداشتن هیچ‌گونه بدخیمی‌های هماتولوژیک و دیگر بیماری‌ها بود. نمونه بیماران از آزمایشگاه پیوند (مربوط به بخش خصوصی شهر تهران) جمع‌آوری گردید.

سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 با ۱۰ درصد FBS و ۲ میلی‌لیتر ال ـ گلوتامین و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین ۱۰۰واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (گیبکو) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصدCO2 درانکوباتور مرطوب کشت داده شد.

استخراج RNA به وسیله محلول ترایزول (اینویتروژن) طبق پروتکل انجام شد. سپس جهت از بین بردن هرگونه آلودگی DNA با RNase-Free DNaseI تیمار گردید. میزان کیفیت و خلوص RNA تام سلولی با اسپکتروفتومتری NanoDrop 2000 مورد بررسی قرار گرفت. تمامیت نمونه RNA استخراج شده با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد تأیید شد.

سنتز cDNA، ۱ میلی‌گرم از RNA با استفاده از کیت پرایم اسکریپت(تاکارا) طبق پروتکل انجام شد و فرآیند qRT-PCR به وسیله SYBR Premix Taq II (TAKARA Japan) با دستگاه ABI step one انجام گردید (جدول ۱).

پرایمرهای مربوط به تکثیر هر قطعه با نرم‌افزار Primer3 طراحی گردید و صحت و کارایی آن ابتدا با بلاست و سپس در واکنش PCR بررسی گردید(جدول ۲).

کارایی PCR با معادله زیر برای ژن‌های مورد مطالعه و ژن خانه‌دار β2-M محاسبه گردید.

$$\text{Fold change} = ۲^{-\Delta\Delta CT}$$

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism و آزمون‌های آماری تی تست و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱ : برنامه زمان و دما برای واکنش Real Time PCR

مرحله	چرخه	دما°C	زمان
واسرشتگی اولیه	۱	۹۵	۱۰ دقیقه
واسرشتگی	۴۰	۹۵	۱۵ ثانیه
اتصال		۶۰	۱ دقیقه
گسترش		۷۲	۱ دقیقه

جهت رسم منحنی ذوب دما از ۵۰ درجه سانتی گراد به ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرد.

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

جدول ۲: توالی آغازگرها برای بررسی بیان ژن . پرایمرها به و سیله نرم‌افزار primer3 طراحی گردید و صحت و کارایی آنها با واکنش PCR مورد سنجش قرار گرفت

ژن	جهت	ترادف
SMAD3	Forward	5'CGGAGACACATCGGAAGAG 3'
	Reverse	5'CGAACTCCTGGTTGTTGAAG3'
SMAD4	Forward	5'CCAACTTTCCCAACATTCC3'
	Reverse	5'GGTAGTGCTGTTATGATGGTAAG3'
β2-M	Forward	5'ATGCCTGCCGTGTGAAC 3'
	Reverse	5'ATCTTCAAACCTCCATGATG 3'

یافته‌ها

در این مطالعه به منظور تأیید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی دایمر پرایمر و آلودگی از آنالیز منحنی ذوب استفاده گردید. بررسی اختصاصی بودن تکثیر در واکنش Real-Time PCR با آنالیز پیک منحنی ذوب برای ژن‌های SMAD3 و SMAD4 انجام شد(جدول ۳). هر یک از پیک‌ها نمایان گر دمای ذوب یک محصول PCR است. پلات تکثیر مربوط به هر ژن نیز نشان داده شده است(شکل ۱).

وجود تنها یک پیک برای هر ژن در دمای ذوب ویژه آن نشان دهنده اختصاصی بودن محصول تکثیر می‌باشد(شکل۲). در راستای تأیید نتایج منحنی ذوب محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز گردید(شکل۳).

نتایج به دست آمده پس از آنالیز در نرم‌افزار GraphPad prism نشان داد بیان ژن SMAD3 در بیماران مبتلا به CML و هم‌چنین در رده سلولی K562 نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری کاهش یافته است. هم‌چنین یافته‌های حاصل از بررسی ارتباط بیان ژن SMAD4 با بیماری CML در این بیماران و در رده سلولی K562 نسبت به گروه کنترل نشان داد که رابطه معنی‌داری وجود ندارد($p<0/05$)(نمودار۱).

بحث

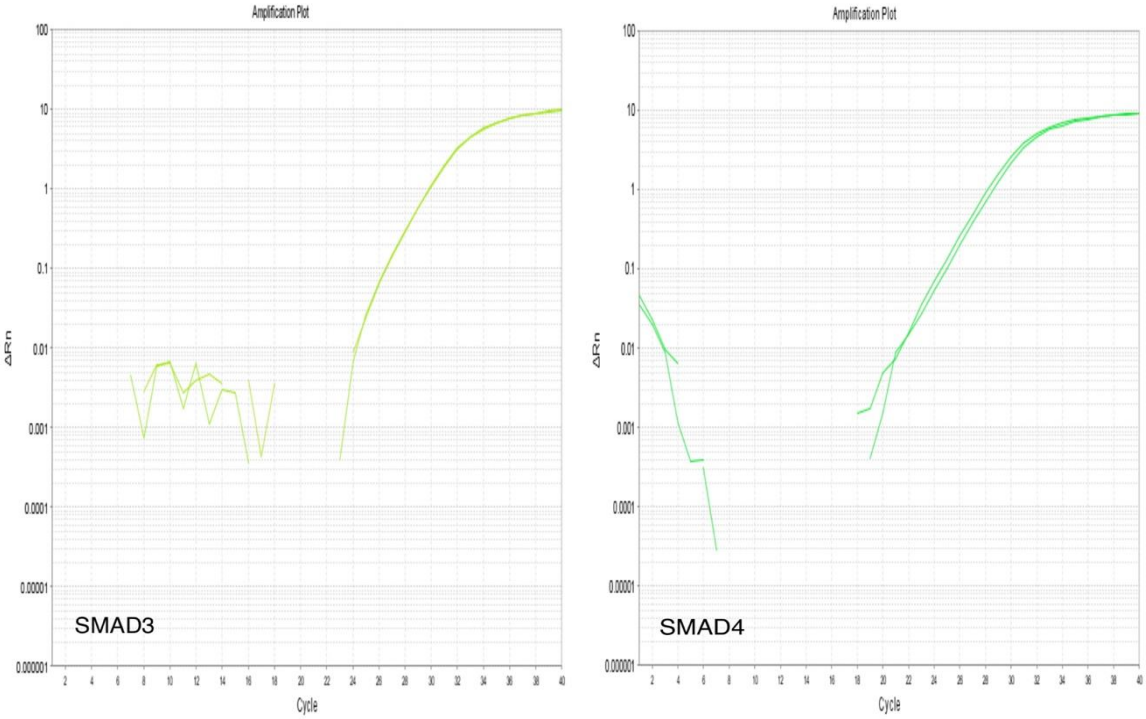
با توجه به اینکه تغییرات بیانی در هر یک از اجزای مسیر های پیام رسانی سلولی می تواند در بیماری زایی نقش داشته باشد، بررسی این تغییرات اهمیت ویژه ای دارد، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی بیان ژن‌های SMAD3 وSMAD4 در بیماران مبتلا به CML و رده سلولی K562 بود.

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

جدول ۳: اطلاعات تجزیه و تحلیل آماری مربوط به ژن‌های SMAD3 وSMAD۴ و میانگین fold change یا میزان بیان ژن‌ها با حجم نمونه ۴۰ بیمار و ۴۰ کنترل

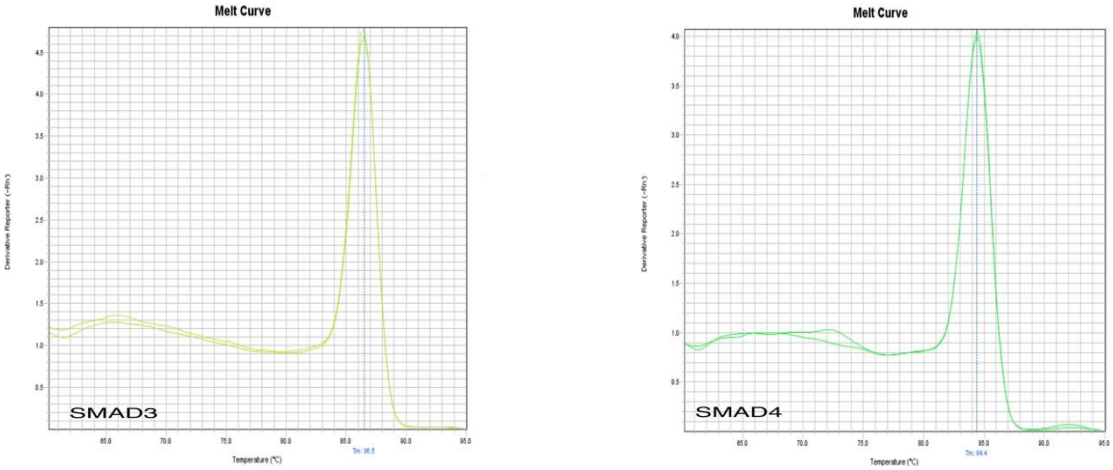
SMAD4آزمون T test
A: ctrl ستون
B: SMAD4 ستون
سطح معنی‌داری = ۰/۳۶۶۴
ارتباط معنی دار وجود ندارد : ns "خلاصه سطح معنی‌داری
۱/۰۵۶ "کنترل $۲^{-\Delta\Delta CT}$ میانگین
۱/۳۰۵ "بیماران $۲^{-\Delta\Delta CT}$ میانگین
حجم نمونه بیماران ۴۰
حجم نمونه کنترل ۴۰
SMAD3آزمون T test
A: ctrl ستون
B: SMAD3 ستون
سطح معنی‌داری = ۰/۰۰۰۱
ارتباط معنی دار وجود دارد : **** "summary سطح معنی‌داری
۱/۰۵۸ "کنترل $۲^{-\Delta\Delta CT}$ میانگین
۰/۲۶۶۰ "بیماران $۲^{-\Delta\Delta CT}$ میانگین
حجم نمونه بیماران ۴۰
حجم نمونه کنترل ۴۰



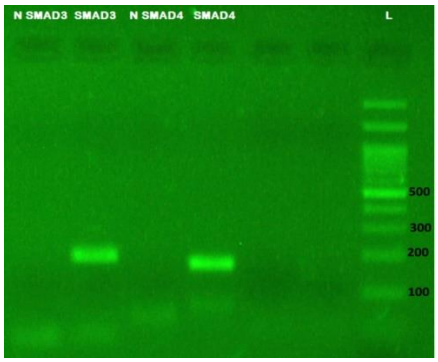
شکل ۱: نمونه ای از پلات تکثیر مربوط به هر ژن از واکنش Real Time PCR

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

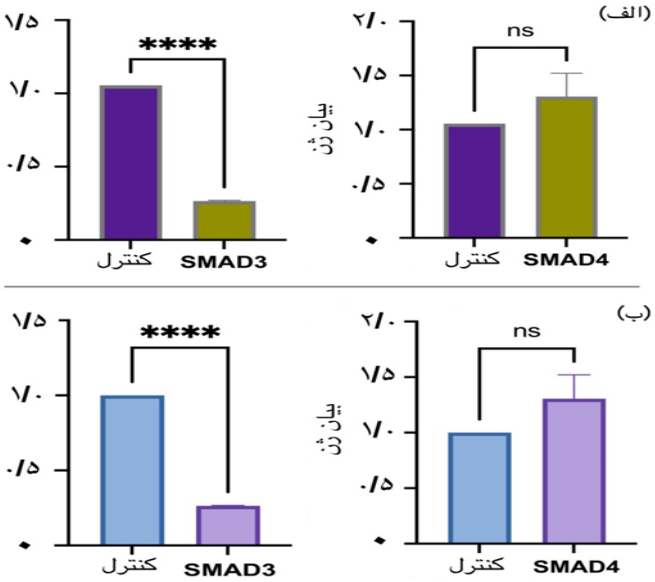
[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]



شکل ۲: نمودار منحنی ذوب برای ژن SMAD3 و SMAD4. هر پیک نماینگر اختصاصیت تکثیر محصول واکنش می‌باشد.



شکل ۳: نتایج حاصل از واکنش Real Time PCR بر روی ژل آگاروز



نمودار۱: بررسی میزان بیان هر ژن و ارتباط آن با بیماری: (الف) نمودار میزان بیان ژن‌های smad3 و smad4 در بیماران مبتلا به CML در مقایسه با گروه کنترل نشان دهنده کاهش بیان smad3 و عدم وجود رابطه معنی‌دار برای smad4 می‌باشد(p<۰/۰۰۱)، (ب) بررسی fold change ژن smad3 نشان می دهد که در رده سلولی k562 کاهش بیان داشته(p<۰/۰۰۰۱). بیان ژن smad4 ارتباط معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان نمی‌دهد

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

با مطالعه و بررسی میزان بیان این ژن‌ها، به این نتیجه دست یافتیم که بیان ژن SMAD3 در بیماران و هم‌چنین رده سلولی K562 به طور معنی‌داری کاهش یافته بود، ولی تغییرات بیانی ژن SMAD4 هیچ گونه ارتباط معنی‌داری را نشان نداد.

لوسمی میلوئیدی مزمن یک اختلال هماتولوژیکی می‌باشد که از ترانسفورماسیون سلول‌های بنیادی به پیشساز سلول‌های خونی بدخیم ایجاد می‌گردد. همان‌طور که پیش‌تر گفته شد شروع فرآیند بیماری با شکل‌گیری کروموزوم فیلادلفیا صورت می‌گیرد، بیان این ژن ادغامی مسئول تغییرات مولکولی که منجر به بدخیمی‌های هماتولوژیکی می‌شود(۲۵).

مسیر پیام رسانی TGFβ / Smad یک مسیر مولکولی چند منظوره می‌باشد و فعالیت‌های مختلف سلولی مانند آپوپتوز تمایز تکثیر تغییر فرم ماتریکس خارج سلولی را تنظیم می‌نماید.

گیرنده‌های TGF-β یک و دو باعث فسفریلاسیون R-Smads (Smad۲ و Smad۳) می‌شوند که در نهایت منجر به شکل‌گیری کمپلکس Co-Smad یا SMAD4 و قرار گیری آن در هسته جهت هدف گیری بیان ژن ها می شود(۱۵).

مشاهدات و مستندات متعددی نشان دهنده ارتباط مسیر TGF- β/ Smad و سرطان می باشد. نقص عملکرد در نتیجه جهش ها در این مسیر و یا کاهش بیان گیرنده ها منجر به تغییرات اپی ژنتیکی در سرطان‌های متعدد شامل سرطان روده دستگاه گوارش آمپولاری کارسینوما گلیوما وغیره می شود(۲۶).

کاهش بیان ژن SMAD4 در سرطان‌های متعدد گزارش گردیده است و نیز با پیش‌بینی بهتر جهت ابتلاء به سرطان‌ها در ارتباط می‌باشد(۲۷).

در بدخیمی‌های هماتولوژیک شامل AML و لنفوم T-cell میزان پایین بیان SMAD4 نیز دیده شده است.

هنوز ارتباط بین مسیر پیام‌رسانی TGF- β/ Smad در CML به وضوح مشخص نشده است و به مطالعات بیشتری جهت بررسی این ارتباط نیاز است(۲۶).

بیلی و همکاران در مطالعه بر روی ارتباط بیان SMAD3 و تکثیر و آپوپتوز در سلول‌های سرطان کلون دریافتند جهش در ژن‌های SMAD4 و SMAD3 منجر به افزایش بدخیمی‌ها و تهاجم سلول‌ها می‌شود که حاکی از اهمیت هدف‌گیری مسیر پیام رسانی TGF-β در سرطان کلون می‌باشد. در حقیقت مسیر TGF-β در ۳۰ الی ۴۰ درصد سرطان‌های کلون دچار نقص می‌باشد. هم‌چنین فقدان یا کاهش پیام رسانیTGF- β در پی نقص و جهش در SMADها یا گیرنده‌ها به صورت چشم‌گیری با گسترش و متاستاز سرطان در بیماران در ارتباط می‌باشد(۲۸ و ۱۵).

در مطالعه‌ای دیگر به وسیله ژانگ و همکاران در مورد مقاومت دارویی و ارتباط آن با بیان SMAD4 در رده سلولی k562 گزارش نمودند که SMAD4 یک ژن سرکوب کننده تومور می‌باشد و کاهش بیان آن

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]
[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

منجر به مقاومت به درمان‌های شیمیایی مانند ایماتینیب می شود. همچنین این کاهش بیان با میزان بقای بیماران مبتلا به سرطان ریه و پانکراس در ارتباط می باشد(۲۹).

آلازوزی و همکاران بر روی نقش تشخیصی SMAD4 به عنوان یک بیومارکر در سرطان کلورکتال پژوهش‌هایی انجام داده‌اند. نتایج حاکی از آن است که جهش در ژن SMAD4 و تغییرات در سطح بیان آن می‌تواند پیشرفت تومور تأثیرگذار باشد(۳۰).

محدودیت‌های این طرح در جمع‌آوری تعداد بیشتر نمونه‌های بیمار در فازهای مختلف بیماری و بررسی میزان بیان در آنها می‌باشد، لذا جهت تکمیل این مطالعه پیشنهاد می‌شود بیان این ژن‌ها در جامعه بیماران مبتلا به CML در فازهای مختلف بیماری مورد بررسی قرار گیرد و هم‌چنین تأثیر و برهمکنش دیگر اعضای خانواده TGF-β در CML و بیماران مقاوم به درمان‌های دارویی نیز مطالعه گردد. این پژوهش‌ها به تعیین دقیق‌تر نقش عملکردی این ژن‌ها در روند پیشرفت بیماری کمک می‌نماید.

نتیجه‌گیری

با توجه با اهمیت مسیر پیام‌رسانیTGF-β و اجزای آن در سرطان‌ها به ویژه بدخیمی‌های هماتولوژیک، بررسی تأثیرات بیانی ژن‌های دخیل در این مسیر می‌تواند اطلاعات زیادی در جهت پیشگیری تشخیص و درمان بیماری‌ها فراهم آورد. ژن‌های SMAD3 و SMAD4 در برخی بیماری‌ها دچار کاهش یا افزایش بیان گردیده‌اند که این تغییرات می‌تواند در روند پیشرفت سرطان‌ها یا بدخیمی دخیل باشد.

در مطالعه حاضر نتایج نشان می‌دهد که بیان SMAD3 در بیماران مبتلا به CML در فاز مزمن به طور معنی‌داری کاهش یافته و میزان بیان SMAD4 در این افراد تغییرات معنی‌داری را نشان نداد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکتری رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد اخلاق ETHICS-2301-1094 می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

REFERENCES

1.Wang B, He F, Hu Y, Wang Q, Wang D, Sha Y, et al. Cancer incidence and mortality and risk factors in member countries of the " Belt and Road " initiative. BMC Cancer. 2022;22(1):582.
2.Koretzky GA. The legacy of the Philadelphia chromosome. J Clin Invest 2007; 117(8): 2030-2.
3.Grover A, Sanjuan-Pla A, Thongjuea S, Carrelha J, Giustacchini A, Gambardella A, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. Nat Commun 2016; 7: 11075.
4.Hamad A, Sahli Z, El-Sabban M, Mouteirik M, Nasr R. Emerging Therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. Stem Cells International 2013; 2013: 724360.
5.Ribera JM. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. Still a pending matter. Haematologica 2021; 106(6): 1514-6.
6.Muffly L, Kebriaei P. Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia in adults: Therapeutic options and dilemmas in 2020. Semin Hematol 2020; 57(3): 137-41.
7.O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003; 348(11): 994-1004.
8.Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. Stem Cells 2006; 24(6): 1476-86.
9.Derynck R, Turley SJ, Akhurst RJ. TGFbeta biology in cancer progression and immunotherapy. Nat Rev Clin Oncol 2021; 18(1): 9-34.
10.Syed V. TGF-beta Signaling in Cancer. J Cell Biochem 2016; 117(6): 1279-87.
11.Dong M, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. Blood 2006; 107(12): 4589-96.
12.Elkholy RA, Fouda MH, Elhawary EE, Elkholy RA, Elshora OA. Impact of CD105 flow-cytometric expression on childhood b-acute lymphoblastic leukemia. J Blood Med 2021; 12: 147-56.
13.Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature 1994; 370(6488): 341-7.
14.Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J 2000; 19(8): 1745-54.
15.Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature 2003; 425(6958): 577-84.
16.Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A ,Maki K, Ogawa S, et al. Mutations of the Smad4 gene in acute myelogeneous leukemia and their functional implications in leukemogenesis. Oncogene 2001; 20(1): 88-96.
17.Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. J Cell Sci 2001; 114(24): 4359-69.
18.Li Z, Li J, Shan X, Gui S, Li C, Zhang Y. Expression of transforming growth factor beta1, smad3, and phospho-smad3 in somatotropinomas and their relationship to tumor behavior. World Neurosurg 2021; 153: e20-e7.
19.Massague JXi Q. TGF-beta control of stem cell differentiation genes. FEBS Lett 2012; 586(14): 1953-8.
20.Shi X, DiRenzo D, Guo LW, Franco SR, Wang B, Seedial S, et al. TGF-beta/Smad3 stimulates stem cell/developmental gene expression and vascular smooth muscle cell de-differentiation. PLoS One 2014; 9(4): e93995.
21.Tefferi A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006;:240-5.
22.Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF-beta/SMAD4 signaling in cancer. Int J Biol Sci 2018; 14(2): 111-23.
23.Roelen BA, Cohen OS, Raychowdhury MK, Chadee DN, Zhang Y, Kyriakis JM, et al. Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 285(4): C823-30.
24.Zhang Y, Musci T, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. Curr Biol 1997; 7(4): 270-6.
25.Shokeen Y, Sharma NR, Vats A, Dinand V, Beg MA, Sanskaran S, et al. Association between altered expression and genetic variations of transforming growth factor beta-smad pathway with chronic myeloid leukemia. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2018; 12(1): 14-22.

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

26.Andreeff M, Wang R-y, Davis RE, Jacamo R, Ruvolo PP, McQueen T, et al. Proteomic, Gene expression, and micro-rna analysis of bone marrow mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia identifies pro-inflammatory, pro-survival signatures in vitro and in vivo. Blood 2013; 2(21): 3685-
27.Singh P, Srinivasan R, Wig JD, Radotra BD. A study of Smad4, Smad6 and Smad7 in surgically resected samples of pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with clinicopathological parameters and patient survival. BMC Res Notes 2011; 4: 460.
28.Bailey KL, Agarwal E, Chowdhury S, Luo J, Brattain MG, Black JD, et al. TGFbeta/Smad3 regulates proliferation and apoptosis through IRS-1 inhibition in colon cancer cells. PLoS One 2017; 12(4): e0176096.
29Zhang J, Zhang M, Liang Y, Liu M, Huang Z. Downregulation of Smad4 expression confers chemoresistance against imatinib mesylate to chronic myeloid leukemia K562 cells. Hematology 2022; 27(1): 43-52.
30.Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, Sammalkorpi H, Jarvinen H, Mecklin JP, et al .SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. Clin Cancer Res 2005; 11(7): 2606-11.

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal(YUMSJ)

Original Article

Investigation of SMAD3 and SMAD4 Genes Expression in CML Patients and K562 Cell Line

Mahdloo T, Godarzi HR*, Jafarinia M

Department of Genetic, Marvdasht branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Received: 27 Dec 2022 Accepted: 02 Mar 2023

Abstract

Background & aim: Chronic myeloid leukemia or CML is a clonal myeloproliferative disorder with abnormal Philadelphia chromosome cytogenetic index. One of the important signaling pathways in the process of proliferation and apoptosis of cancer cells and disease pathogenesis is β-TGF, the dysregulation of the expression of its components, such as the SMAD family, plays a significant role in regulating tumor growth and cancer development. Therefore, the aim of the present study was to determine and investigate the expression of SMAD3 and SMAD4 genes in patients with CML and K562 cell line.

Methods: the present descriptive case-control study was conducted in 2020 at the Islamic Azad University, Marvdasht Branch. The statistical population of the research included 80 people who referred to the link and were divided into two groups; 40 patients with CML were selected as the case group and 40 healthy individuals as controls, matched in terms of age and sex, and K562 cell line. The expression levels of SMAD3 and SMAD4 genes were measured by Real Time PCR and cDNA synthesis, and the collected data were analyzed using one-way ANOVA T-test.

Results: The SMAD3 gene was significantly decreased in CML patients and this was as well observed in the K562 cell line ($p<0.0001$) and the level of SMAD4 gene expression in the patients and the K562 cell line did not display any significant relationship with the disease ($p<0.0001$). 0.001) P values less than 0.05 were considered.

Conclusion: According to the results of the present study, the expression of some genes in the signaling pathways can play an effective role in the development of disease or drug resistance. The decrease in SMAD3 expression in CML can indicate the relationship between the disease and the disorder in gene expression.

Keywords: CML, TGF- β, SMAD3, SMAD4

***Corresponding author: Godarzi HR,** Department of Genetic, Marvdasht branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
Email:

Please cite this article as follows: Mahdloo T, Godarzi HR, Jafarinia M . Investigation of SMAD3 and SMAD4 Genes Expression in CML Patients and K562 Cell Line. Armaghane-danesh 2023; 28(3): 416-428.

[Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir on 2023-12-06]

[DOI: 10.52547/armaghanj.28.3.8]