مطالعه اثر كاهش بيان گيرنده نوع يك فاكتور رشد شبه انسولين (IGF-IR) بر روي مقاومت پرتوئي سلول هاي سرطان پروستات انساني (DU-145)

**راضيه جلال[1,2]، سعيد انصاری مجد[2]، شميلا درويشعليپور[2]، حسين مزدرانی [3]

1. گروه شيمی، دانشكده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ايران 2. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتيک و زيست فناوری، تهران، ايران 3. دانشكده علوم پزشكی، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران

چكيده: سرطان پروستات يكي از متداول ترين سرطان هاي شناخته شده در بين مردان بوده كه بسته به مرحله بيماري روش هاي درماني متفاوتي براي درمان آن بكار گرفته مي شود. يكي از موثرترين روش هاي درماني در سرطان پروستات پرتودرماني مي باشد. مشاهده گرديده است كه تومورهاي يكسان پاسخ هاي درماني متفاوت به پرتو از خود نشان مي دهند و حساسيت تومورهاي مشابه به پرتو متفاوت است. در پي بررسي عوامل موثر در ايجاد مقاومت پرتوئي تومورها، گيرنده نوع يك فاكتور رشد شبه انسولين (IGF-IR) به دليل داشتن فعاليت هاي ضد مرگ سلولي از طريق فعال سازي مسيرهاي متعدد در برابر محرك هاي مسير انتقال پيام مرگ سلول، به عنوان يكي از عوامل ايجاد مقاومت پرتوئي در برخي از تومورها شناخته شده است. مطالعات نشان داده است كه دودمان سلولي DU-145، دودمان سلولي سرطان پروستات انساني غير وابسته به آندروژن، IGF-IR را بيان مي كند و همچنين مقاوم به پرتو مي باشد. به منظور بررسی نقش IGF-IR در مقاومت پرتوئی سلول های DU-145، بيان IGF-IR در سلول های مذكور با استفاده از يك وكتور بيان كننده آنتي سنس گيرنده IGF-I كاهش داده شد و سپس سلول ها در معرض پرتو با دزهاي صفر، 2 و 6 گري قرار گرفت. نتايج حاصل از اين تحقيق نشان داد كه كاهش بيان IGF-IR باعث افزايش حساسيت سلول هاي DU-145 به پرتو شده است. لذا مي توان IGF-IR را به عنوان يكي از عوامل درگير در ايجاد مقاومت پرتويي سلول هاي DU-145 پيشنهاد نمود.

مقدمه: سرطان پروستات دومين سرطان كشنده در بين مردان اغلب كشورهاي پيشرفته جهان است. شيوع اين بيماري با افزايش سن، افزايش يافته و احتمال وقوع آن در مردان بالاتر از 50 سال افزايش مي‌يابد (1). بسته به اينكه سرطان در چه مرحله‌اي قرار دارد از روش هاي درماني متفاوتي- جراحي، پرتودرماني، هورمون درماني و شيمي درماني - استفاده مي شود (4-2). علي رغم مزيت‌هاي چشمگير پرتودرماني در درمان سرطان مشخص شده است تومورهايي وجود دارند كه حتي در دزهاي بسيار بالا به پرتو مقاوم بوده و سطح بالايي از توانايي اصلاح و تغيير آسيب‌هاي پرتوئي وارده را دارا مي‌باشند (5). با تشخيص يك تومور مقاوم به پرتو و با بكاربردن نوع ديگري از درمان مي توان اقدامي موثر و سريع‌تر در درمان سرطان انجام داد. در اين راستا با گسترش تكنيك‌هاي زيست‌شناسي مولكولي و با پيشرفت روزافزون تكنولوژي تلاش هاي متعددي در تشخيص فاكتورها و ماركرهاي مولكولي درگير در حساسيت پرتويي تومورها انجام گرفته است. شواهد نشان مي دهند كه بيان بيش از حد IGF-IR در برخي از سلول‌هاي سرطاني با مقاومت پرتويي تومور مرتبط مي‌باشد و آن را به عنوان عامل بقاء در برخي از سلول‌هاي مقاوم به پرتو شناخته‌اند. همچنين در مطالعات بسياري نشان داده شده است كه افزايش بيان اين گيرنده در سرطان هاي مختلف با افزايش مقاومت داروئي و پرتوئي همراه مي باشد. واضح است كه چنين يافته‌هايي، استراتژي‌هاي جديد براي ايجاد بهبودي در پاسخ سرطان به پرتودرماني را در ذهن مي‌پروراند (8- 6). در اين تحقيق نقش گيرندهٔ نوع يك IGF در مقاومت پرتوئي سلول هاي سرطان پروستات انسان مورد بررسي قرار

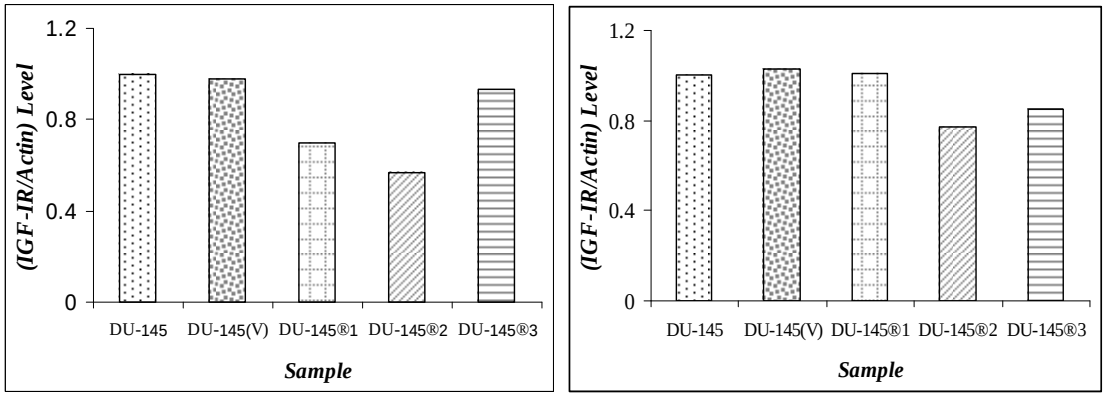
گرفت. بدين منظور بيان IGF-IR در دودمان سلولي سرطان پروستات انسان، DU-145 ، با استفاده از تكنولوژي آنتي سنس به طور قابل ملاحظه اي كاهش داده شد و سپس اثر پرتو گاما با دزهاي صفر، 2 و 6 گري بر روي رشد و قدرت كلني زائي سلول هاي DU-145 بررسي شد.

مواد و روش ها: به منظور ساخت وكتور بيان كننده آنتي سنس IGF-IR (وكتور pIGF-IRAS) يك قطعه 700 جفت بازي از توالي IGF-IR در وكتور pBK-CMV (در جهت آنتي سنس نسبت به پروموتور CMV) كلون شد. وكتور pBK-CMV يك وكتور فاژميدي مي باشد كه به عنوان Expression Vector در سلول هاي يوكاريوتي مورد استفاده قرار مي گيرد و داراي پروموتور CMV و ژن مقاومت به نئومايسين مي باشد. سلول ها ي DU-145 كه در محيط كشت RPMI-1640 حاوي FBS 10 % كشت داده شده بودند يا با وكتور pIGF-IRAS (DU-145®) و يا با وكتور pBK-CMV (كنترل - DU-145(v)) ترانس فكت شدند. با افزورن نئومايسين با غلظت 0/4 mg/ml به محيط كشت، سلول هاي ترانس فكت شده پايدار DU-145(v) و DU-145® انتخاب شدند. به منظور بررسي ميزان بيان IGF-IR در سطح پروتئين و mRNA آزمايشات ايمينوبلات (بلات) و RT-PCR انجام شد. مقدار 0/5 ميكروگرم از عصاره سلولي سلول هاي DU-145 شاهد، DU-145 (v) و DU-145® بر روي غشاء PVDF برده شد و مراحل دات بلات با استفاده از آنتي بادي هاي منوكلنال بر عليه IGF-IR و اكتين (كنترل داخلي) صورت گرفت. با استفاده از برنامه كامپيوتري Total Lab، دانسيته تمام دات ها اندازه گيري شد و نسبت دانسيته بدست آمده براي دات مربوط به هر سلول در آزمايش دات بلات با استفاده از آنتي بادي برعليه IGF-IR به دانسيته بدست آمده براي دات مربوط به همان سلول در آزمايش دات بلات با استفاده از آنتي بادي برعليه اكتين تقسيم شد و بدين ترتيب نسبت پروتئين IGF-IR/Actin براي هر سلول محاسبه گرديد. پس از استخراج RNA كل و سنتز cDNA، آزمايش PCR با استفاده از پرايمرهاي IGF-IR و اكتين براي تمام سلول هاي مذكور انجام شد و محصول PCR بر روي ژل 1% آگارز مورد بررسي قرار گرفت. دانسيته باندهاي مربوط به IGF-IR و اكتين با استفاده از برنامه Total Lab اندازه گيري شد و نسبت دانسيته باند مربوط به IGF-IR به دانسيته باند مربوط به اكتين براي هر يك از سلول ها محاسبه شد. در مرحله بعد، سلول هاي DU-145 شاهد، DU-145 (v) و DU-145® در معرض تابش پرتو گاما (چشمه كبالت 60) با دزهاي 0، 2 و 6 گري (Gy) قرار گرفتند. شمارش سلولي به مدت 96 ساعت پس از پرتودهي انجام شد و منحني رشد رسم گرديد. همچنين قدرت كلني زائي بررسي شد. بدين منظور از هر نمونه سلولي بر حسب دز پرتو تابيده شده، تعداد متفاوتي سلول در ظروف 60 mm در 5 ml محيط كشت حاوي 10% سرم كشت داده شدند و پس از 9 روز كلني هاي ايجاد شده با استفاده از كريستال ويوله رنگ آميزي شد. پس از شمارش تعداد كلني ها، .P.E% [100 * (تعداد سلول كشت داده شده / تعداد كلنی بدست آمده) = .P.E%] محاسبه گرديد.

نتايج و بحث: به منظور كاهش بيان گيرندۀ IGF-I در سلول هاي DU-145، از استراتژي آنتي سنس بر عليه گيرندۀ IGF-I جهت بلوكه كردن عملكرد آن استفاده گرديد. نتيجه دو بار آزمايش ترانس فكسيون: تهيه سلول هاي ترانسفكت شده پايدار DU-145(V) و سه كلون پايدار از سلول هاي DU-145(R) (با نام هاي $DU\text{-}145®_1$، $DU\text{-}145®_2$ و $DU\text{-}145®_3$) بود. نتايج بدست آمده از آزمايش ايمينوبلات نشان داد كه نسبت IGF-IR/Actin در سلول هاي DU-145و DU-145(V) برابر يك مي باشد در حاليكه اين نسبت در كلون هاي

DU-145®$_2$ و DU-145®$_3$ كاهش يافته است (شكل -1a). كاهش بيان اين گيرنده در سلول هاي DU-145®$_2$ بيشتر از سلول هاي DU-145®$_1$ و DU-145®$_3$ است و نسبت به نمونه هاي كنترل به ميزان 23 درصد كاهش يافته است. نتايج RT-PCR نشان داد كه نسبت IGF-IR/Actin در سلول هاي DU-145®$_2$ در مقايسه با سلول هاي DU-145 شاهد و DU-145(V) در سطح RNA، 43% كاهش يافته است (شكل -1b). سپس سلول هاي DU-145 شاهد، DU-145(V) و DU-145®$_2$ در معرض پرتو قرار گرفتند و رشد و قدرت كلني زائي آنها مورد بررسي قرار گرفت. نتايج بدست آمده از آزمايش بررسي قدرت كلني زائي سلول هاي DU-145 شاهد، DU-145(V) و DU-145®$_2$ پس از پرتودهي نشان داد كه كاهش P.E.%در سلول هاي DU-145®$_2$ پس از پرتودهي با دزهاي صفر، 2 و 6 گري، به ترتيب 39/9% ، 43/2% و 61/4% است (جدول-1). به علاوه دزهاي صفر و 2 گري باعث كاهش نسبي رشد سلول هاي DU-145®$_2$ نسبت به سلول هاي DU-145 شاهد و DU-145(V) شده در حاليكه در دز 6 گري اين كاهش رشد افزايش يافته است. نتايج حاصل از اين تحقيق نشان داده است كه كاهش بيان پروتئين IGF-IR در سلول هاي DU-145®$_2$ با كاهش قدرت كلني زائي و مقاومت پرتوئي همراه مي باشد. لذا با توجه به نتايج اين طرح به نظر مي رسد كه گيرندۀ IGF-I را مي توان به عنوان يكي از فاكتورهاي درگير در ايجاد مقاومت پرتوئي در سلول هاي سرطان پروستات در نظر گرفت و با كاهش بيان آن در سلول هاي سرطان پروستات بتوان حساسيت پرتوئي اين سلول ها را افزايش داد.

(b) (a)



شكل 1- هيستوگرام نسبت دانسيته IGF-IR/Actin در سلول هاي DU-145 شاهد، DU-145(V)، DU-145®$_1$، DU-145®$_2$ و DU-145®$_3$ با استفاده از برنامه Total Lab. (a)- آزمايش دات بلات، (b)- آزمايش RT-PCR.

جدول **1** - P.E.% بدست آمده از آزمايش بررسي قدرت كلني زائي براي سلول هاي DU-145 شاهد، DU-145(V) و DU-145®$_2$ پس از پرتودهي با دزهاي صفر، 2 و 6 گري.

Irradiation Dose (Gy)	DU-145 Cell No.	DU-145 %P.E.	DU-145(V) Cell No.	DU-145(V) %P.E.	DU-145(R)$_2$ Cell No.	DU-145(R)$_2$ %P.E.
0	19/62±	5/79	20/88 ±	6/66	11/80 ±	2/20

	500	500	1000
2	3/70 ± 0/72 1000	4/40 ± 1/55 1000	2/10 ± 0/18 2000
6	0/57 ± 0/10 5000	0/44 ± 0/19 5000	0/22 ± 0/09 10000

منابع:

1. Fournier, G., Valery, A., Mangin, P., and Cussenot, O. (2004) Prostate cancer. *Treatment. Ann Urol.* 35:225-258.
2. Sikora, K., and Halnan, K.E. (1990) "Prostate Cancer" in " Treatment of cancer" 2nd edition, pp 518-533, Chapman and Hall medical, London.
3. Dearnaley, D.P., Sydes, M.R. Mason, M.D. (2003) A double-blind, placebo-controlled, randomizedntrail of oral sodium clodronate for metastatic prostate cancer. *Natl Cancer Inst.* 95:1300-1311.
4. Studer, U.R., Hauri, D., and Hanselmann, S. (2004) Immediate versus deferred hormonal treatment for patient with prostate cancer who are not suitable for curative local treatment. *Clin Oncol.* 22:4109-4118.
5. Hande, M.P., Azizova, T.V., Geard, C.R., Burak, L.E., Mitchell, C.R., Khokhryoka, V.F., Vasilenko, E.K., and Brenner, D.J (2003) Past exposure to densely ionizing radiation leaves a unique permanent signature in the genome. *Am J Hum Genet.* 72:1162-1170.
6. Macaulay, V.M., Salisbury, A.J., Bohula, E.A., Playford, M.P., Smorodinsky, N.I., and Shiloh, Y (2001) Downregulation of the type 1 insulin-like growth factor receptor in mouse melanoma cells is associated with enhanced radiosensitivity and impaired activation of Atm kinase. *Oncogene.* 20:4029-40.
7. Peretz, S., Kim, C., Rockwell, S., Baserga, R., and Glazer, PM (2002) IGF1 receptor expression protects against microenvironmental stress found in the solid tumor. *Radiat Res.* 158:174-80.
8. Turner, B.C., Haffty, B.G., Narayanan, L., Yuan, J., Havre, P.A., Gumbs, A.A., Kaplan, L., Burgaud, J.L., Carter, D., Baserga, R., and Glazer, P.M. (1997) Insulin-like growth factor-I receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res.* 157:3079-3083.

Abstract

Prostate carcinoma is the most commonly diagnosed cancer in men and the treatment approach of prostate cancer depends on the stage of disease. Radiotherapy is one of the most effective approaches in the treatment of prostate cancer. Some of similar tumors have shown different responses to the radiotherapy and their sensitivities to radiation are different. Studies on the effective agents in the resistance of tumors against radiotherapy have indicated that the type I insulin-like growth factor (IGF-IR) is one of the radioresistance agents in some tumors, since it has anti-apoptotic activity and can activate several pathways in the apoptotic signal transduction after stimulation. It has been shown that DU-145 cell line, human androgen independent prostate cancer cell line, is radioresistance and IGF-IR is overexpressed in this cell line. In order to study the role of IGF-IR in the radioresistance of DU-145 cells, the expression of IGF-IR was reduced by antisense technology and then cells were exposed to the radiation (0, 2, and 6 Gy).

The results of the present study have shown that the reduction of IGF-IR in the DU-145 cells could increase the radiosensitivity of these cells. Therefore, we suggest that IGF-IR can be one of the effective agents in the radioresistance of DU-145 cells.