

## The Role of Leptin in Pathophysiology of Myeloma Cells

Najmeh Vaghef, M.Sc.<sup>1</sup>, Saeid Abroun, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Saeid Kaviani, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Kamran Alimoghadam, M.D.<sup>2</sup>, Sharbanoo Rostami, M.Sc.<sup>1</sup>, Bahare Sadeghi, M.Sc.<sup>1</sup>,  
Najmedin Saki, M.Sc.<sup>1</sup>, Gholamreza Khamisipour, M.Sc.<sup>1</sup>,

1. Hematology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
2. Hematology and Oncology Research Center, Shariati Hospital, Tehran Medical Sciences University, Tehran, Iran

\* Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Hematology Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: abroun@modares.ac.ir

Received: 2/June/2010, Accepted: 21/September/2010

### Abstract

**Objective:** In order to achieve the best therapeutic strategy with which to treat multiple myeloma (MM), it is necessary to understand the molecular mechanisms of myeloma cell growth. In addition to genetic defects, the bone marrow microenvironment (BMM) plays a primary role in MM pathophysiology. For many years, interleukin-6 (IL-6) was considered to be a central growth factor in myeloma cells. However, recent evidence indicates that increasing numbers of cytokines enhance myeloma cell growth in BMM. In this study, we investigated the possibility that leptin could be a member of cytokine network that supports myeloma cells.

**Materials and Methods:** The expression of leptin and its receptors in cell lines, bone marrow (BM) and mononuclear peripheral blood (PB) were analysed by RT-PCR. Additionally, leptin serum levels were analysed by ELISA and the effect of leptin on growth of cell lines by cell culture.

**Results:** According to our results, leptin and its receptors were expressed in cell lines, myeloma BM and PB mononuclear cells (MNC). However the PB mononuclear cells of treated myeloma patients did not express leptin and differed in the expression of leptin receptors. Acute lymphoid leukemia, B-blasts (B-ALL) did not express leptin and its receptors. Untreated myeloma and B-ALL patients had high and low levels of leptin in their serum, respectively. Recombinant exogenous leptin enhanced the growth of RPMI8866 but did not affect the growth of U266 and Jurkat.

**Conclusion:** Regarding this study and the findings of other studies, leptin may play a role in MM pathophysiology. Therefore leptin and its receptors might be analysed as a therapeutic target for myeloma BMM.

**Keywords:** Multiple Myeloma, Leptin, U266 Cell Line

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 319-328

## نقش لپتین در پاتوفیزیولوژی سلول‌های مایلومایی

نجمه واقف **M.Sc.**، سعید آبرون **Ph.D.**\*، سعید کاویانی **Ph.D.**، کامران علی مقدم **M.D.**،  
شهربانو رستمی **M.Sc.**، بهاره صادقی **M.Sc.**، نجم‌الدین ساکی **M.Sc.**، غلامرضا خمیسی‌پور **M.Sc.**

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه خون‌شناسی، تهران، ایران

۲. دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات خون و آنکولوژی بیمارستان شریعتی، تهران، ایران

\* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه خون‌شناسی  
پست الکترونیک: [Email: abroun@modares.ac.ir](mailto:abroun@modares.ac.ir)

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۳۰

## چکیده

\* **هدف:** بررسی نقش احتمالی لپتین به عنوان عضوی از شبکه سایتوکاینی شرکت کننده در حفظ حیات سلول‌های مایلومایی

\* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از تکنیک‌های RT-PCR برای ارزیابی بیان ژن‌های لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک هسته‌ای نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی بیماران مایلومایی، ELISA برای اندازه‌گیری میزان لپتین سرم این بیماران و از Cell Culture به منظور بررسی اثر لپتین بر رشد رده‌های سلولی در *in vitro* استفاده شده است.

\* **یافته‌ها:** رده‌های سلولی و تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان و خون محیطی بیماران مایلومایی درمان نشده لپتین و گیرنده‌های آن را بیان نمودند اما بیماران درمان شده لپتین را بیان نکرده، بیان متفاوتی از گیرنده‌ها را نشان دادند. در بلاست‌های (Acute lymphoid leukemia, B-blasts; B-ALL) بیان لپتین و گیرنده هایش مشاهده نگردید. میزان لپتین سرم بیماران مالتیپل مایلوما و B-ALL به ترتیب افزایش و کاهش نشان دادند. لپتین سبب افزایش رشد رده سلولی RPMI8866 گردید، اما بر رشد رده‌های سلولی U266 و Jurkat اثری نداشت.

\* **نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های فوق، ممکن است لپتین در پاتوفیزیولوژی مالتیپل مایلوما نقش داشته باشد و بتوان لپتین و گیرنده هایش را به عنوان یکی از هدف‌های درمانی، مورد مطالعه قرار داد.

\* **کلیدواژگان:** مالتیپل مایلوما، لپتین، رده سلولی U266

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۲۸-۳۱۹

## مقدمه

مالتیپل مایلوما (Multiple Myeloma) یک نوع بدخیمی پلازما سل است که حدود ۱۰ درصد از سرطان‌های خون را به خود اختصاص می‌دهد و از نظر شیوع، دومین سرطان خون بعد از لنفوم غیرهوجکین می‌باشد. بیماران مبتلا به مایلوما از استئوپروز و درد شدید استخوان رنج می‌برند. از دیگر علائم مایلوما می‌توان به ترشح فاکتورهای فعال‌کننده استئوکلاست‌ها (Osteoclast Activating Factor; OAF) از پلازماسل‌های بدخیم، نقص در عملکرد کلیه به دلیل افزایش کلسیم خون و دفع پروتئین بنس‌جونس، کم‌خونی به دلیل اختلال در هماتوبویسیس در نتیجه جای‌گیری سلول‌های بدخیم در مغز استخوان و عفونت‌های مکرر به دلیل ناکارآمد بودن انبوه ایمونوگلوبولین‌های تولید شده، اشاره نمود (۱-۳).

اعتقاد بر این است که مالتیپل مایلوما توسط آسیب‌های ژنتیکی مانند جابه‌جایی‌های کروموزومی که سبب قرارگیری آنکوژن در کنار ژن سازنده زنجیره‌های ایمونوگلوبولین می‌شود، ایجاد می‌گردد. این جابه‌جایی افزایش بیان آنکوژن را به دنبال خواهد داشت. سیگنال‌هایی که سبب حفظ، بقا و رشد سلول شده، تحریک می‌شود و سیگنال‌هایی که سبب آپوپتوز می‌باشند، غیرفعال می‌گردند (۴-۷).

شناخته‌شده‌ترین فاکتور رشد مایلوماها اینترلوکین-۶ (Interlukin-6; L-6) می‌باشد که تصور می‌شود نقش بسیار مهم را در پاتوژنز و رشد بدخیم سلول‌های مایلومایی ایفا می‌کند

(۸، ۹). تحریک سلول‌ها توسط IL-6 سبب انتقال سیگنال JAK/STAT از طریق gp-130 گیرنده IL-6 و فسفریلاسیون STAT می‌گردد. این راه انتقال سیگنال پیوسته در سلول‌های بدخیم بیماران مایلومایی و برخی رده‌های سلولی مایلومایی مانند U266 فعال است (۹-۱۲). نشان داده شده است که موش‌هایی که ژن IL-6 آنها سرکوب شده است، توانایی توسعه پلازماسل‌های توموری را ندارند (۱۳). این مشاهدات اهمیت بالقوه این راه انتقال سیگنال و اثر ضد آپوپتوز آن را نشان می‌دهد و آن را هدف اصلی برای مداخلات درمانی قرار می‌دهد. اما نتایج آزمایشات کلینیکی اولیه با آنتی‌بادی‌های ممانعت‌کننده IL-6 ناامید کننده بوده و نتایج کلینیکی قابل توجهی برای آنها شرح داده نشده است (۱۴). سازگار با این نتایج، سلول‌های مایلومایی که گیرنده IL-6 آنها بلوکه شده است، در هم‌کشتی با سلول‌های استرومای مغز استخوان زنده می‌مانند (۱۰). این نتایج نقش اساسی IL-6 را مورد سوال قرار داده و پیشنهاد می‌کند راه‌های انتقال سیگنال دیگری علاوه بر راه انتقال سیگنال فعال شده توسط IL-6 بر بقای سلول‌های مایلومایی اثر می‌گذارد. بررسی‌های جزئی راه‌های انتقال سیگنال آشکار کردند که در سلول‌های مایلومایی علاوه بر راه انتقال سیگنال JAK/STAT، راه انتقال سیگنال Ras/MAPK نیز فعال است؛ هر چند که IL-6 می‌تواند مسیر MAPK را نیز فعال کند، بلوکه نمودن گیرنده IL-6 فسفریلاسیون STAT3 را بلوکه می‌نماید اما اثری بر فعال‌سازی MAPK ندارد؛ بنابراین STAT3 از

مغز استخوان در فعال نمودن شبکه ای از راه های انتقال سیگنال در سلول های مایلومایی، نقش دارد که نتیجه آن حفظ بقای این سلول ها و پیشرفت تومور می باشد (شکل ۱). علت این امر که راه های انتقال سیگنال چگونه با یکدیگر مرتبط هستند، تا حدود زیادی ناشناخته مانده است (۱۵-۱۸).

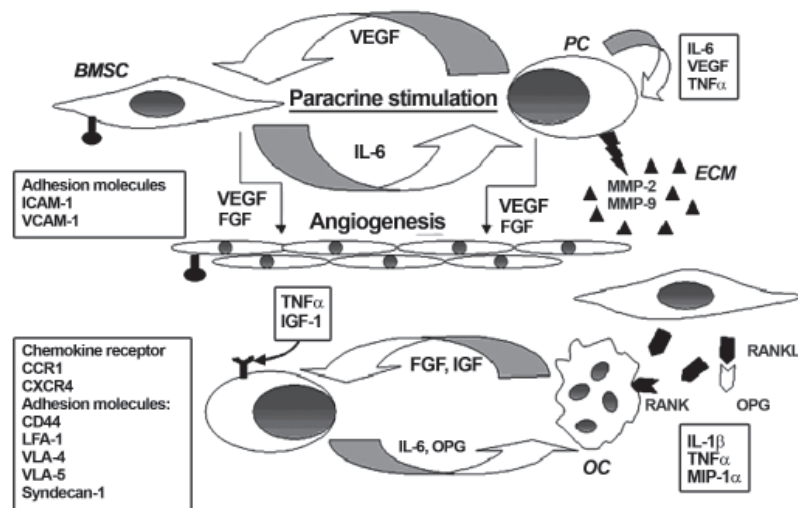
مطالعات نشان داده است که علاوه بر IL-6 سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد دیگری مانند:

Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ), Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ), Stromal Cell-Derived Factor 1Alpha (SDF-1 $\alpha$ ), B-Cell Stimulating Factor 3 (BSF-3), Fibroblast Growth Factor (FGF), Interleukin-21 (IL-21)

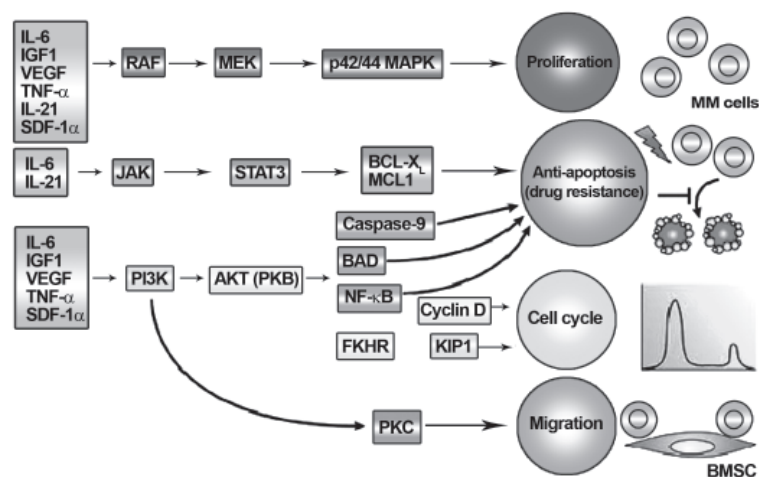
طریق اتصال IL-6 به گیرنده اش و راه MAPK توسط مکانیزم های وابسته و غیروابسته به IL-6 فعال می گردد (۱۰).

بلوکه نمودن راه MAPK به تنهایی اثرات ممانعتی بسیار کمی بر رشد و حیات سلول های مایلومایی دارد. اما به طور قطع ممانعت از هر دو راه انتقال سیگنال JAK2/STAT3 و Ras/MAPK سبب آپوپتوز این سلول ها می گردد. حتی هنگامی که در حال رشد در حضور سلول های استرومای مغز استخوان هستند. این امر نشان دهنده نقش مستقل هر دو راه انتقال سیگنال JAK2/STAT3 و Ras/MAPK در رشد و حیات سلول های مایلومایی است (۱۰).

راه های انتقال سیگنال و مدیاتورهای مرکزی دیگری که اواخر گزارش شده است به حیات و بقای سلول های مایلومایی کمک می کند که عبارتند از: Wnt, Notch, PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B. واضح است که علاوه بر موتاسیون های آنکوژنیک، ریز محیط



شکل ۱: ریز محیط مغز استخوان در مالتیپل مایلوما



Nature Reviews | Cancer

شکل ۲: نقش سایتوکاین ها در حفظ بقا و رشد سلول های مایلوما

در فلاسک‌های T25 و T75 با رعایت شرایط استریل کشت داده شد.

### نمونه‌های بیماران

نمونه‌های آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی بیماران مراجعه کننده به بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعی تهران بر اساس رضایت بیماران و مجوز کمیته اخلاق پزشکی شماره ۱۵۰/۸۲۸۵۹ در ضد انعقاد Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) به میزان ۱/۲ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر خون در لوله‌های پلاستیکی در پیچ دار استریل ۱۵ میلی لیتری (لوله‌های فالدکون) گرفته شد.

نمونه‌های بیماران شامل:

۱. نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما
۲. نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی دو فرد سالم
۳. نمونه آسپیراسیون مغز استخوان و خون محیطی دو فرد مبتلا به Acute lymphoid leukemia, B-blasts (B-ALL) و یک فرد درمان شده AML Acute Myeloid leukemia (AML)

### استخراج RNA رده‌های سلولی و تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان

برای استخراج RNA، رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI1640 با FBS ۱۰ درصد در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $CO_2$  ۵ درصد کشت داده شدند. پس از اینکه تعداد آنها به  $1 \times 10^6$  در هر میلی لیتر محیط کشت رسید، از آنها رسوب سلولی تهیه شد. تک‌هسته‌ای‌های نمونه‌های مغز استخوان و خون محیطی نیز که در ضد انعقاد EDTA تهیه شده بودند، به وسیله Ficol-Paque بر اساس Gradient Centrifugation Density جدا شدند. سپس با روش تریزول آنها استخراج شد. به طور خلاصه، پس از اضافه نمودن تریزول ( $1 \times 10^6$  سلول بر میلی لیتر / 1ml trizol) به مدت ۱۵ ثانیه کاملاً ورتکس نموده، ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده، دوباره ورتکس گردید. در مرحله بعد به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم به ازای هر ۱ میلی لیتر تریزول اضافه شد. درب تیوب‌ها را محکم بسته، به شدت با دست یا ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده، ۳ دقیقه در دمای اتاق اینکوبه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با نیروی ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آبی را به یک تیوب RNase Free جدید منتقل نموده، به ازای هر ۱ میلی لیتر تریزول اولیه ۰/۵ میلی لیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. محتوی لوله‌ها را به خوبی مخلوط نموده، در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده سپس به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (بیشتر نباشد) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پلاک RNA را یکبار با حداقل ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد به ازای هر ۱ میلی لیتر تریزول اولیه (سمیل به طور کامل با دست یا ورتکس مخلوط گردد) با نیروی ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت شست‌وشو سانتریفیوژ گردید. سپس بدون اینکه پلات RNA حل شود، مایع رویی تا جایی که امکان داشت خالی گردید، پلات RNA را در داخل میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده، قبل از اینکه به طور کامل خشک شود. (خشک شدن کامل پلات RNA می‌تواند سبب کاهش حلالیت آن گردد)، RNA را در آب RNase Free (به طور مثال ۲۰ میکرو لیتر) به وسیله پر و خالی کردن آن با بی‌بی پت حل شد. در پایان میکروتیوب حاوی RNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. RNA در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

به عنوان بخشی از عوامل پاتوژنز در مالتیپل مایلوما مطرح می‌باشد. این سایتوکاین‌ها از سلول‌های استرومایی، اندوتلیالی، استئوکلاست‌ها و سلول‌های مایلومایی ترشح شده، بقا، رشد و مهاجرت سلول‌های مایلومایی و هم‌چنین رگ‌سازی در ریز محیط مغز استخوان را افزایش می‌دهند. بنابراین جهت القای مرگ موثر در سلول‌های مایلومایی به جای ممانعت از یک راه یا سایتوکاین خاص می‌بایست شبکه پیچیده راه‌های انتقال سیگنال در ریز محیط مغز استخوان مورد هدف درمانی قرار گیرد (شکل ۲).

در این مطالعه با توجه شباهت ساختمانی لپتین به سایتوکاین‌های با زنجیره بلند ماریپچی مانند IL-6، شباهت ساختمانی گیرنده آن به خانواده سایتوکاینی IL-6 (gp-130)، توانایی لپتین در فعال کردن راه‌های JAK/STAT و MAPK و افزایش میزان سرمی لپتین در بیماران مالتیپل مایلوما را داراست. احتمال اینکه لپتین عضوی از شبکه سایتوکاینی شرکت کننده در بقا و رشد سلول‌های مایلومایی باشد، مورد بررسی و بحث قرار گرفته است.

لپتین پپتیدی ۱۶ کیلو دالتونی با ۱۶۷ اسید آمینه است؛ به طور عمده توسط آدیپوسایت‌ها تولید می‌شود و نقش اساسی آن در بالانس انرژی بدن می‌باشد به این مفهوم که از طریق گردش خون به مغز رفته و در آنجا بر روی گیرنده‌های خود در هیپوتالاموس اثر نموده سبب کاهش اشتها می‌گردد. لپتین شباهت‌های ساختمانی قابل توجهی با اعضای خانواده سایتوکاینی با زنجیره بلند ماریپچی مانند:

Leukemic Inhibitory Factor (LIF), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Oncostatin-M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1), IL-6, IL-11, IL-12

داراست. لپتین از طریق گیرنده‌های داخل غشایی که شباهت ساختمانی به جز انتقال دهنده سیگنال گیرنده‌های سایتوکاینی کلاس یک (gp-130) مانند گیرنده‌های

Prolactin, Erythropoietin G-csf, Growth Hormon (GH), IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, Leukemic Inhibitory Factor (LIF) را نشان می‌دهد، از طریق فعال نمودن راه‌های انتقال سیگنال مختلف مانند JAK/STAT, MAPK, PI3K عمل می‌کند.

لپتین به عنوان یک سایتوکاین چند کاره در همه بافتها عمل می‌کند. به همین دلیل در عملکردهای سلول‌های مختلف درگیر است. لپتین علاوه بر کنترل توده بدن (۱۹)، در تولید مثل (۲۰)، رگ‌سازی (۲۱)، ایمنی‌زایی (۲۲-۲۴)، هماتوپویسیس (۲۵-۲۷)، بهبود زخم (۲۸)، بازسازی استخوان (۲۹-۳۲) و عملکرد قلبی-عروقی (۳۳)، دارای عملکرد است.

### مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها

رده‌های سلول

رده‌های سلولی:

1. U266 (Myeloma)
2. RPMI 8866 (B-Lymphoid Leukemia)
3. Jurkat (T cell-Leukemia)
4. 937 (Histiocytic lymphoma)

در محیط کشت RPMI1640، در حضور پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر) و ۱۰ درصد Fetal Bovin Serum (FBS) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $CO_2$  ۵ درصد

با کیت Biovender اندازه گیری شد. هم چنین محتویات فلاسک های حاوی رده های سلولی مایلومایی U266 و لنفوییدی RPMI 8866 در فاز لگاریتمی در شرایط استریل را به لوله فالكون انتقال داده با دور ۱۲۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ شد سپس مایع رویی (Condition Media; CM) را جمع آوری نموده، میزان لپتین آن به روش الایزا با کیت Biovender اندازه گیری شد.

#### بررسی اثر لپتین بر رشد رده های سلولی

رده های سلولی Jurkat 8866، RPMI و U266، به تعداد ۲۰۰۰۰ میلی لیتر در پلیت های ۲۴ خانه ای در محیط کشت RPMI FBS، ۲ درصد، CO<sub>2</sub> ۵ درصد، ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور و عدم حضور لپتین تجارتي نو ترکیب انسانی خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich با غلظت های مختلف کشت داده شدند و تعداد آنها هر روز شمارش شد. قبل از بررسی اثر لپتین بر روی رده های سلولی در پلیت، Viability سلول ها با تریپان بلوی ۰/۴ درصد در بافر نمکی فسفات، بررسی شد که طی آن سلول ها ۱۰ درصد زنده بودند.

#### یافته ها

##### بیان لپتین و گیرنده های آن

جهت بررسی بیان لپتین و گیرنده های آن در نمونه ها شامل رده های سلولی و سلول های تک هسته ای مغز استخوان و خون بیماران و افراد نرمال، پس از تهیه cDNA از RNA استخراج شده از سلول های هر نمونه، با پرایمرهای اختصاصی لپتین و گیرنده های نوع بلند و کوتاه آن و پرایمرهای  $\beta$ -Actin و یا (GAPDH کنترل داخلی) که سکانس آنها در بخش مواد و روش ها ذکر شده است، در دستگاه ترموسایکلر، PCR انجام شد و پس از الکتروفورز محصولات PCR و عکس برداری از ژل ها با دستگاه Gel Digital Documentation نتایج به شرح زیر بود:

##### بیان لپتین و گیرنده های آن در رده های سلولی

در رده های سلولی مورد مطالعه: U266 (Myeloma), RPMI 8866 (B-Lymphoid Blastoma), U937 (Histiocyt lymphoma), Jurkat (T cell-Leukemia) لپتین و گیرنده های نوع بلند و کوتاه آن، بیان گردید. هم چنین  $\beta$ -Actin و یا GAPDH تمام cDNA های ساخته شده مثبت بود (شکل ۳).

##### بیان لپتین و گیرنده های آن در سلول های تک هسته ای مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما

سلول های تک هسته ای مغز استخوان پنج بیمار مایلومایی و هم چنین سلول های تک هسته ای خون محیطی یک بیمار مایلومایی لپتین و هر دو نوع گیرنده لپتین را بیان نمودند (شکل ۴).

##### بیان لپتین و گیرنده های آن در سلول های تک هسته ای مغز استخوان بیماران مایلومایی درمان شده و مقایسه آن با فرد مایلومایی درمان نشده

بیماران مایلومایی تحت درمان با تالیدوماید و کورتیکواستروئیدها لپتین را بیان نکردند و بیان متفاوتی از گیرنده ها را نشان دادند؛ به این معنا که یا هر دو نوع گیرنده، یا هیچ کدام و یا تنها یک نوع گیرنده را بیان نمودند (شکل ۵).

#### بررسی بیان ژن لپتین و گیرنده های آن به روش RT-PCR سنتز از cDNA از RNA

با استفاده از کیت cDNA سازی خریداری شده از شرکت فرمتاز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت از cDNA، RNA ساخته شد. به طور خلاصه، ابتدا Random Hexamer به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شد. در مواردی که غلظت RNA پایین باشد، آب استفاده نمی شود به جای آب، ۹ میکرولیتر RNA استفاده می گردد (مقدار مورد نیاز RNA برای سنتز cDNA، ۲-۱ میکروگرم می باشد). سپس Master Mix به نسبت زیر تهیه گردید:

2  $\mu$ l dNTP + 1  $\mu$ l RNase inhibitor + 1  $\mu$ l Reverse Transcriptase + 4  $\mu$ l 5x Buffer

به جز موارد استثناء ۹ میکرولیتر از Random Hexamer رقیق شده را در یک میکروتیوب ریخته و ۲ میکرولیتر RNA به آن اضافه گردید، میکروتیوب را ۳ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد اینکوبه نموده، سپس بلافاصله روی یخ قرار داده شد، Master Mix را به آن اضافه نموده و مخلوط گردید و ۱۵ تا ۳۰ ثانیه Spin شد، ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد، سپس به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد اینکوبه شد. برای پایان دادن به واکنش میکروتیوب به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد یا به مدت ۵ دقیقه در ۹۹ درجه سانتی گراد قرار داده شد. cDNA در دمای ۲۰- نگهداری می شود.

#### PCR

بیان ژن های لپتین و گیرنده های نوع بلند و کوتاه لپتین با پرایمرهای اختصاصی زیر و شرایط ذکر شده در (جدول ۱) با روش PCR بررسی شد.

پرایمرهای لپتین:

Forward : 5'- GAC TTC TAT TCC TGG GCT CCA CC -3'  
Reverse : 5' - CCT GAA GCT TCC AGG ACA CC -3'

پرایمرهای گیرنده نوع بلند (long OB-R):

Forward : 5'- CCA GAA ACG TTT GAG CAT CT -3'  
Reverse : 5'- CAA AAG CAC ACC ACT CTC TC -3'

پرایمرهای گیرنده نوع کوتاه (short OB-R):

Forward : 5'- GAC TCG TTG TGC AGT GTT CAG -3'  
Reverse : 5'- TGG CAC ATT GGG TTC ATC -3'

پرایمرهای بتا اکتین ( $\beta$ -Actin) (کنترل داخلی):

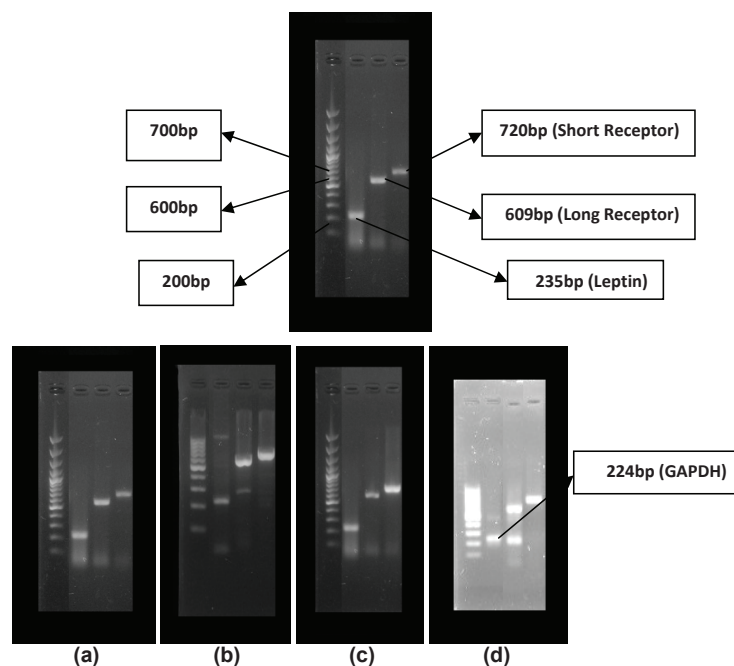
Forward : 5'- CTGGCCGGGACCTGACTGA -3'  
Reverse : 5'- TCA GGC AGC TCG TAG CTC TTC -3'

جدول ۱: شرایط و اندازه محصولات PCR

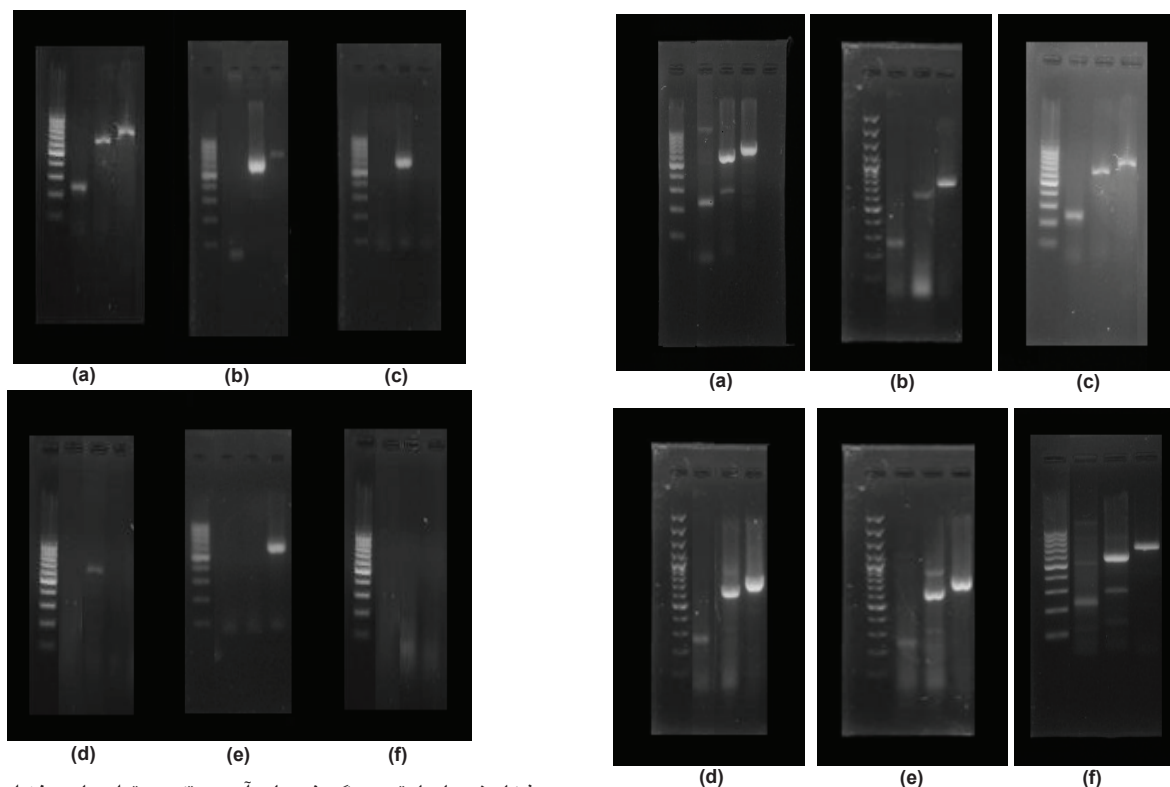
Gene	Annealing temperature	Number of cycles	size of target bands
Leptin	61°C	35	(235 bp)
Long OB-R	55°C	35	(609 bp)
Short OB-R	59°C	35	(720 bp)
GAPDH	57°C	35	(224 bp)
$\beta$ -Actin	59°C	35	(190 bp)

#### اندازه گیری میزان لپتین

برای مقایسه میزان لپتین پلاسمای افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما و ALL، نمونه خون محیطی سه بیمار مایلومایی و دو فرد ALL-B با سانتیفریوژ با نیروی ۱۸۰۰ دور جدا شد و میزان لپتین آن به روش الیزا



شکل ۳: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در رده‌های سلولی (d: U937 ،c: Jurkat ،b: RPMI 8866 ،a: U266)



شکل ۵: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان افراد مایلومایی درمان شده و مقایسه آن با فرد مایلومایی تازه تشخیص داده شده. a: سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان بیمار مایلومایی، b: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار مالتیپل مایلومای درمان شده و مشکوک به عود، c, d, e, f: تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیماران مالتیپل مایلومای درمان شده.

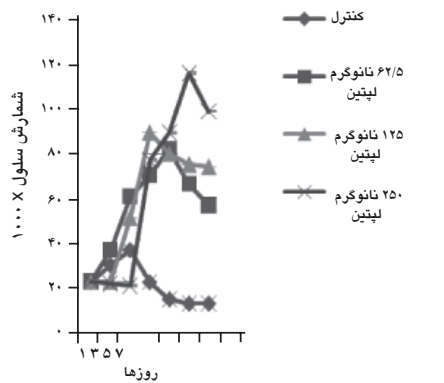
شکل ۴: بیان لپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان افراد مبتلا به مالتیپل مایلوما. (a, b, c, d, e): سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان پنج بیمار مایلومایی، (f): سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی یک بیمار مایلومایی.

جدول ۲: مقدار لیپتین پلاسمای نمونه‌ها

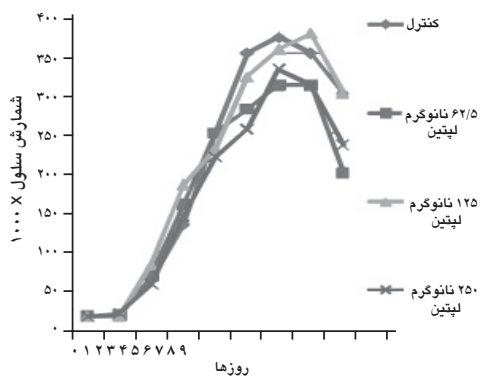
نمونه	MM	MM	MM	ALL	ALL	U266	RPMI 8866
مقدار لیپتین برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر	۳/۷	۳/۹	۲/۴	۰/۸	۰/۱	۰	۰

اثر لیپتین بر رشد رده‌های سلولی

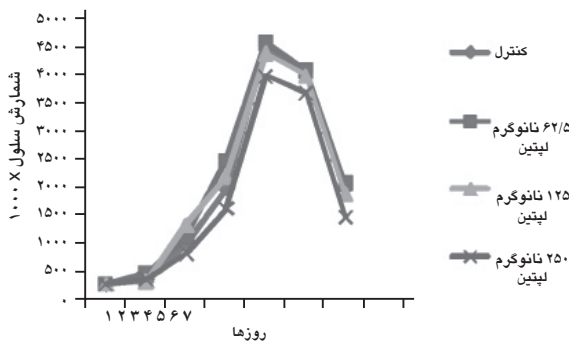
لیپتین بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی لئوفییدی نوع B (RPMI8866) وابسته به دوز موثر بود (نمودار ۱) اما بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی مایلومایی U266 (نمودار ۲) و رده سلولی لئوفییدی نوع (T Jurkat) (نمودار ۳) اثری نداشت.



نمودار ۱: اثر لیپتین بر رشد سلول‌های RPMI8866

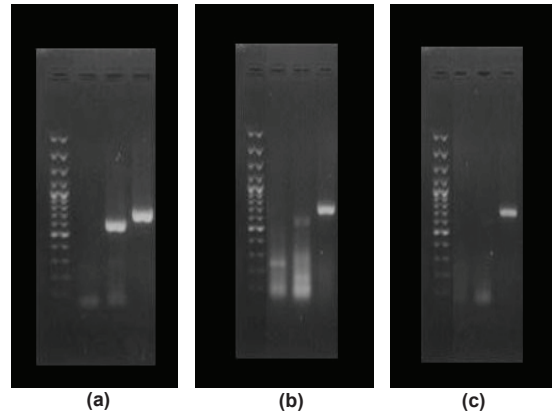


نمودار ۲: اثر لیپتین بر رشد سلول‌های U266



نمودار ۳: اثر لیپتین بر رشد سلول‌های Jurkat

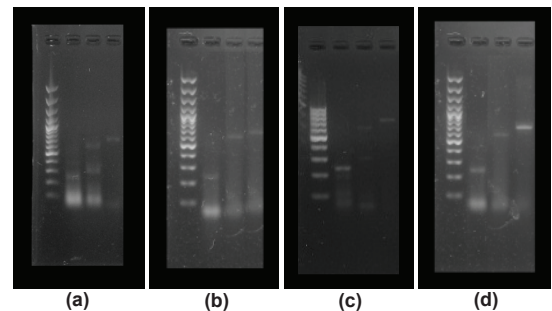
بیان لیپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان دو فرد B-ALL درمان نشده و یک فرد AML درمان شده تک هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار B-ALL pre با شمارش ۹۶ درصد بلاست، لیپتین و گیرنده نوع بلند را بیان نکردند و تنها گیرنده نوع کوتاه را بیان نمودند. تک هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار B-ALL با شمارش ۳۵ درصد بلاست، لیپتین و هر دو نوع گیرنده لیپتین را بیان نمودند و تک هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار AML درمان شده لیپتین را بیان نکردند ولی هر دو نوع گیرنده را بیان نمودند (شکل ۶).



شکل ۶: بیان لیپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان دو فرد B-ALL و یک فرد AML درمان شده. a: تک هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار B-ALL pre با شمارش ۹۶ درصد بلاست. b: تک هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار B-ALL با شمارش ۳۵ درصد بلاست c: تک هسته‌ای‌های مغز استخوان بیمار AML درمان شده.

بیان لیپتین و گیرنده‌های آن در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و مغز استخوان افراد نرمال

تک هسته‌ای‌های خون محیطی و مغز استخوان افراد نرمال، لیپتین و هر دو نوع گیرنده لیپتین را بیان نمودند (شکل ۷).



شکل ۷: بیان لیپتین و گیرنده‌های آن در تک هسته‌ای‌های مغز استخوان و خون محیطی فرد نرمال. a و b: تک هسته‌ای‌های خون محیطی دو فرد نرمال لیپتین و هر دو نوع گیرنده لیپتین را بیان می‌کنند. c و d: تک هسته‌ای‌های مغز استخوان دو فرد نرمال لیپتین و هر دو نوع گیرنده لیپتین را بیان می‌کنند.

میزان لیپتین پلاسما

میزان لیپتین پلاسمای خون محیطی بیماران مایلومایی بیشتر از بیماران B-ALL بوده و در CM رده‌های سلولی مایلومایی U266 و لئوفییدی RPMI8866 میزان لیپتین با روش الیزا صفر بوده است (جدول ۲).

## بحث

در این تحقیق نشان داده شد که لپتین و گیرنده‌های آن توسط تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان افراد مایلومایی و رده سلولی مایلومایی U266، لنفوییدی نوع (B RPMI8866)، لنفوییدی نوع T (Jurkat) و لنفومای هیستوسیتی U937 بیان می‌گردد. بنابراین ممکن است لپتین در لوکمیا نقش داشته باشد. به این دلیل که منوکلیرهای مغز استخوان افراد مایلومایی درمان شده مورد مطالعه لپتین را بیان نکردند و بیان متفاوتی از گیرنده‌ها را نشان دادند؛ به این مفهوم که بعضی هر دو نوع گیرنده، برخی هیچ‌کدام از گیرنده‌ها، بعضی تنها گیرنده نوع بلند و بعضی تنها گیرنده نوع کوتاه را بیان نمودند. شاید بتوان نتیجه‌گیری کرد که تالیدوماید (Thalidomide) هم‌چنان که از بر هم‌کنش بین سلول‌های مایلومایی و استرومایی ممانعت نموده، تولید سایتوکاین‌هایی مانند TNF- $\alpha$  و IL-6 را مهار می‌کند و بر بیان لپتین و گیرنده‌های آن نیز اثر مهاری دارد و به دلیل شرکت لپتین در رگ‌سازی ممکن است بخشی از اثر ممانعتی تالیدوماید در رگ‌سازی مربوط به مهار لپتین باشد.

یکی از نمونه‌های مورد مطالعه، پلاسما سل لوکمیا و دارای ۲۰ درصد پلاسما سل در خون محیطی بود؛ بررسی بیان لپتین و گیرنده‌های آن بر روی تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی این بیمار انجام گرفت. نتایج بیان لپتین و گیرنده‌های آن در تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی این بیمار نشان داده شد. از مقایسه شدت رنگ باند‌های لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی این مورد پلاسما سل لوکمیا و تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی فرد نرمال، دیده می‌شود که شدت رنگ این باندها در فرد نرمال بسیار ضعیف‌تر است و اینکه یک مطالعه میزان بیان لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های خون محیطی افراد نرمال توسط Real Time-PCR را بسیار پایین نشان داده است (۳۴) شاید بتوان نتیجه گرفت که سلول‌های مایلومایی لپتین و گیرنده‌هایش را بیان می‌کنند. بنابراین در مغز استخوان احتمال بیان لپتین و گیرنده‌هایش هم توسط سلول‌های مایلومایی و هم ریزمحیط مغز استخوان وجود دارد. احتمال موفقیت در جدا کردن پلاسما سل‌ها از مغز استخوان افراد نرمال به دلیل تعداد بسیار کم آن (۴-۱ درصد) و مقایسه مستقیم میزان بیان لپتین و گیرنده‌هایش در پلاسما سل‌های افراد نرمال و مایلومایی با ستون ماکس کم است.

در این مطالعه نتایج بیان لپتین و گیرنده‌هایش و هم‌چنین کاهش میزان سرمی لپتین در دو بیمار B-ALL متناسب با نتایج مطالعات قبلی است (۳۵، ۳۶). در تک‌هسته‌ای‌های فرد B-ALL pre با شمارش ۹۶ درصد بلاست، لپتین و گیرنده نوع بلند بیان نمی‌شوند. بنابراین بلاست‌های B-ALL لپتین و گیرنده نوع بلند را بیان نمی‌کنند. در فرد B-ALL با شمارش ۳۵ درصد بلاست، بیان لپتین و گیرنده آن مربوط به سلول‌های دیگر غیر بلاست می‌باشد. در یک مطالعه دلیل عدم بیان لپتین و گیرنده آن توسط بلاست‌های B-ALL و کاهش میزان سرمی لپتین در بیماران B-ALL تغییرات ایمنی و سایتوکاینی در این بیماران ذکر شده است (۳۵) اما دلیل قطعی آن هنوز معلوم نیست. در بیماران مایلومایی افزایش میزان سرمی لپتین در این مطالعه و مطالعات قبلی نشان داده شده است (۳۷-۳۹).

لپتین بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی لنفوییدی نوع B

(RPMI8866) وابسته به دوز موثر بوده اما بر رشد، بقا و پرولیفراسیون رده سلولی مایلومایی U266 اثری نداشته است. به دلیل اینکه در ایران تنها رده سلولی مایلومایی موجود U266 می‌باشد، مطالعه اثر لپتین بر رده‌های سلولی دیگر مایلومایی امکان‌پذیر نبود. عدم اثر لپتین بر رشد رده سلولی مایلومایی U266 بر خلاف بیان گیرنده‌های نوع بلند و کوتاه لپتین در این رده سلولی شاید به دلیل ترشح IL-6 توسط رده سلولی مایلومایی U266 و اثر اتوکراین این اینترلوکین بر رشد آن (۴۰) باشد. هم‌چنان که در این مطالعه پس از اضافه نمودن لپتین نوترکیب به محیط کشت سلول‌های Jurkat (T cell-Leukemia)، این رده سلولی گیرنده‌های لپتین را بیان می‌کند، منحنی رشد آنها با کنترل تفاوتی نداشته است که شاید به دلیل ترشح IL-2 توسط این سلول‌ها و اثر اتوکراین این اینترلوکین بر رشد آنها باشد. شاید دلیل دیگر عدم تاثیر لپتین بر رشد این رده‌های سلولی شاید نیاز به هم‌کشتی آنها با سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان باشد. در یک مطالعه دیگر ذکر شده است که اثر آنتی‌آپوپتیک لپتین بر روی سلول‌های بیان‌کننده PML-RAR $\alpha$  در APL نیاز به Cell-to-Cell Contact دارد و این اثر با افزودن لپتین به محیط کشت، بدون حضور آدیپوسیت‌ها اعمال نمی‌شود (۴۱).

بیان لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیماران مایلومایی و تغییر بیان آنها پس از درمان در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شده است. علت تفاوت بیان لپتین و گیرنده‌هایش و هم‌چنین تفاوت میزان سرمی لپتین در بیماران مایلومایی و B-ALL شاید نقش لپتین در پاتوفیزیولوژی سلول‌های مایلومایی باشد. به دلیل اینکه:

۱. این مطالعه و چند مطالعه دیگر افزایش مقادیر سرمی لپتین را در بیماران مالتیپل مایلوما نشان داده است (۳۹-۳۷).
۲. مالتیپل مایلوما بیماری است که به طور عمده افراد مسن را درگیر می‌کند، محتوی چربی در ریز محیط مغز استخوان با افزایش سن افزایش می‌یابد و آدیپوسیت‌ها منبع ترشح لپتین هستند (۳۹).
۳. احتمال ارتباط بین افزایش وزن و ریسک ابتلا به مالتیپل مایلوما (۳۷، ۴۲).
۴. شباهت ساختار سوم لپتین به ساختار سوم اعضای خانواده سایتوکاینی با زنجیره بلند ماریجی مانند: CT-1, LIF, CNTF, OSM IL-12, IL-11, IL-6 (۴۳).
۵. شباهت ساختمانی گیرنده لپتین به جزء انتقال‌دهنده سیگنال گیرنده IL-6 (gp-130) و توانایی لپتین در فعال کردن راه‌های انتقال سیگنال مختلف که مهم‌ترین آنها Ras/MAPK، JAK2/STAT3 و PI3K/Akt می‌باشد (۴۳).
۶. نتایج آزمایشات کلینیکی اولیه با آنتی‌بادی‌های ممانعت‌کننده IL-6 در درمان بیماران مالتیپل مایلوما نامیدکننده بوده و نتایج کلینیکی قابل توجهی برای آنها شرح داده نشده است (۱۴).
۷. زنده ماندن سلول‌های مایلومایی که گیرنده IL-6 آنها بلوکه شده است، در هم‌کشتی با سلول‌های استرومایی مغز استخوان و در نتیجه نقش شبکه سایتوکاینی در بقا و رشد سلول‌های مایلومایی به جای یک سایتوکاین خاص (IL-6) (۱۰).
۸. این مطالعه بیان لپتین و گیرنده‌هایش در تک‌هسته‌ای‌های مغز استخوان بیماران مایلومایی و تغییر بیان آنها را پس از درمان نشان داده است.
۹. نقش لپتین در تحریک رگ‌سازی (۲۱).



چندین مطالعه نشان داده است که لپتین در استخوان‌سازی نقش دارد (۲۹-۳۲). از آنجا که برخی مطالعات میزان سرمی لپتین افراد مایلومایی را بالا نشان داده است (۳۶-۳۸)؛ ممکن است این افزایش با ضایعات لیتیک استخوانی در این بیماران در ارتباط باشد. بررسی چگونگی این ارتباط می‌تواند موضوع مطالعات بعدی نیز باشد.

### تقدیر و تشکر

هزینه‌های مربوط به این طرح تحقیقاتی توسط معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تامین گردیده است. لذا نویسندگان از همکاری این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### References

- Kyle RA. Diagnostic criteria of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992; 6(2): 347-358.
- Hideshima T, Nergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood.* 2004; 104(3): 607-618.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005; 23(26): 6333-6338.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004; 64(4): 1546-1558.
- Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res.* 2004; 64(4): 1546-1558.
- Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood.* 2004; 104: 607-618.
- Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005; 18(4): 509-524.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999; 10: 105-115.
- Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature.* 1988; 332: 83-85.
- Chatterjee M, Stuhmer T, Herrmann P, Bommert K, Dorken B, Bargou RC. Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood.* 2004; 104: 3712-3721.
- Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, Weber D, Alexanian R, Raj-Vadhan S, et al. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood.* 2004; 103: 3175-3184.
- Hilbert DM, Kopf M, Mock BA, Kohler G, Rudikoff S. Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med.* 1995; 182: 243-248.
- Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted antiinterleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin*

### نتیجه گیری

لپتین می‌تواند هم به طور غیرمستقیم از طریق تحریک رگ‌سازی، رشد سلول‌های مایلومایی را افزایش دهد و هم به طور مستقیم یکی از فاکتورهای رشدی باشد که ریز محیط مغز استخوان را برای رشد سلول‌های مایلومایی فراهم می‌سازد. بنابراین شاید لپتین و گیرنده‌هایش را بتوان به عنوان یک هدف درمانی به همراه هدف‌های درمانی دیگر در مالتیپل مایلوما مورد بررسی قرار داد. اما مطالعه‌ای جامع در مورد راه‌های انتقال سیگنال مختلف فعال شده در ریز محیط مغز استخوان مایلومایی توسط شبکه سایتوکاینی و درک چگونگی ارتباط آنها با یکدیگر، برای یافتن راه‌های درمانی موثرتر لازم است.

- Cancer Res. 2003; 9: 4653-4665.
- Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, Bommert K, Golasch H, Dörken B, et al. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia.* 2004; 18: 1883-1890.
- Tai YT, Podar K, Catley L, Tseng YH, Akiyama M, Shringarpure R, et al. Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Cancer Res.* 2003; 63: 5850-5858.
- Klein B, Tarte K, Jourdan M, Mathouk K, Moreaux J, Jourdan E, et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *Int J Hematol.* 2003; 78: 106-113.
- Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. Signaling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 1574-1580.
- Kim KH, Kim YJ, Lee S, Oh SW, Lee K, Park Y, Kim HJ, Kwak H. Evaluation of plasma leptin levels & BMI as predictor of postpartum weight retention. *India J Med Res.* 2008; 128(5): 595-600.
- Bates SH, Myers MG Jr. The role of leptin receptor signaling in Feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14(10): 447-452.
- Mantzoros CS. Role of Leptin in Reproduction. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 900:174-83.
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the Product of Ob Gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.* 1998; 83: 1059-1066.
- Lago R, Gómez R, Lago F, Gómez-Reino J, Gualillo O. Leptin beyond body weight regulation--current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cell Immunol.* 2008; 252(1-2): 139-45.
- Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol.* 2007; 4(1): 1-13.
- La Cava A, Matarese G. The Weight of Leptin in Immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 371-379.
- Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, et al. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(25): 14564-14568.
- Gainsford T, Alexander WS: A Role for Leptin in hemopoieses? *Mol Biotechnol.* 1999; 11: 149-158.
- Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis *Curr Biol.* 1996; 6(9): 1170-1180.
- Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riv-

- eros J, Sierra-Honigmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J*. 2003; 17(13): 1895-1897.
29. Astudillo P, Rios S, Pastenes L, Pino AM, Rodriguez JP. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. *J Cell Biochem*. 2008; 103: 1054-1065.
30. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metab*. 2006; 4: 341-348.
31. Heep H, Wedemeyer C, Wegner A, Hofmeister S, von Knoch M. Differences in trabecular bone of leptin-deficient ob/ob mice in response to biomechanical loading. *Int J Biol Sci*. 2008; 4(3):169-175.
32. Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, et al. Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(24): 21920-21929.
33. Ren J. Leptin and hyperleptinemia-from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol*. 2004; 181: 1-10.
34. Samara A, Marie B, Pfister M, Visvikis-Siest S. Leptin expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is related with blood pressure variability. *Clin Chim Acta*. 2008; 395(1-2): 47-50.
35. Wex H, Ponelis E, Wex T, Dressendörfer R, Mittler U, Vorwerk P. Plasma leptin and leptin receptor expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2002; 76(5): 446-452.
36. Nakao T, Hino M, Yamane T, Nishizawa Y, Morii H, Tatsumi N: Expression of the leptin receptor in human leukaemic blast cells. *Br J Haematol*. 1998; 102: 740-745.
37. Dalamaga M, Karmaniolas K, Panagiotou A, Hsi A, Chamberland J, Dimas C, et al. Low circulating adiponectin and resistin, but not leptin, levels are associated multiple myeloma risk: a case control study. *Cancer Causes Control*. 2009; 20(2): 193-199.
38. Pamuk GE, Demir M, Harmandar F, Yesil Y, Turgut B, Vural O. Leptin and resistin levels in serum of patients With hematologic malignancies: correlation with clinical characteristics. *Exp Oncol*. 2006; 28(3): 241-244.
39. Reseland JE, Reppe S, Olstad OK, Hjorth-Hansen H, Brenne AT, Syversen U, et al. Abnormal adipokine levels and leptin-induced changes in gene expression profiles in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2009; 83: 460-470.
40. Schwab G, Siegall CB, Aarden LA, Neckers LM, Nordan RP. Characterization of an interleukin-6-mediated autocrine growth loop in the human multiple myeloma cell line, U266. *Blood*. 1991; 77(3): 587-593.
41. Tabe Y, Konopleva M, Munsell MF, Marini FC, Zompetta C, McQueen T, et al. PML-RAR {alpha} is associated with leptin-Receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-driven adipocytes in APL cell survival. *Blood*. 2004; 103: 1815-1822.
42. Larsson SC, Wolk A. Body mass index and risk of multiple myeloma: A meta-analysis. *Int. J Cancer*. 2007; 121: 2512-2516.
43. Fruhbeck G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006; 393(Pt 1): 7-20.