مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۱۰، مهر ۱۳۹۶، صفحه ۳۴-۲۸

اثر ضدسرطانی اپرپیتانت بر رده سلولی لوسمیک NB4

الهام رازانی (MSc)[۱]، سمانه بیاتی (PhD)[۲]، آوا صفراوغلی‌آذر (MSc)[۱]، داود بشاش (PhD)[۳*]، سیدحمیدالله غفاری (PhD)[۴]

۱-دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲-موسسه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳-گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴-مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۹۵/۱۲/۲۷، اصلاح: ۹۶/۳/۲۰، پذیرش: ۹۶/۴/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که فعالیت مسیر نوروکینین ۱، در پاتوژنز تعداد کثیری از بدخیمی‌های انسانی از جمله لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic leukemia) (APL)، دخیل می‌باشد. فعالیت این مسیر در سلول‌های لوسمیک منجر به تکثیر بیش از حد سلول‌ها و فرار از آپوپتوز می‌گردد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر اپرپیتانت (مهارکننده گیرنده نوروکینین ۱) بر میزان بقا سلول‌های APL می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی روی رده سلولی NB4، سلول‌هایی مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیتیک حاد که از انستیتوپاستور تهیه گردید، انجام شد. به منظور بررسی اثر ضدتوموری اپرپیتانت، سلول‌های NB4 به ۶ گروه تیمار شده با دارو در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میکرومولار و کنترل تقسیم شدند. سپس درصد زنده‌مانی سلول‌ها، فعالیت متابولیک، القاء آپوپتوز و همچنین بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به ترتیب از طریق تست‌های تریپان‌بلو، MTT assay، رنگ‌آمیزی Annexin/PI و Real-time PCR طی مدت زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت بررسی شد.

یافته‌ها: تیمار ۳۶ ساعته سلول‌های NB4 با بالاترین غلظت اپرپیتانت (۵ میکرمولار)، درصد زنده‌مانی (ارزیابی شده توسط تریپان بلو) و فعالیت متابولیک سلول‌ها (ارزیابی شده توسط MTT assay) را به بیش از ۵۰٪ ($p<۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. همچنین اپرپیتانت جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک را از ۱/۴٪ در گروه کنترل به ۱۰/۶٪ در گروه تیمار شده با دوز ۵ میکرومولار افزایش داد ($p<۰/۰۵$) و آپوپتوز را از طریق افزایش دو برابری نسبت بیان Bax/Bcl-2 فعال نمود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که اپرپیتانت قادر است اثرات کشندگی و ضدتکثیری خود را روی سلول‌های NB4 اعمال نماید.

واژه‌های کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آپوپتوز، اپرپیتانت، رده سلولی NB4.

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL=Acute Promyelocytic Leukemia) یکی از شناخته‌شده‌ترین انواع بدخیمی‌های هماتولوژیک می‌باشد (۱). با وجود آنکه بررسی‌های آزمایشگاهی، طیف وسیعی از ناهنجاری‌های ژنتیکی مرتبط با این بیماری را شناسایی کرده‌اند (۲)، همچنان تلاش برای یافتن سازوکارهای دخیل در پاتوژنز بیماری و بروز مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی، ادامه دارد (۳). مطالعات جدید در حوزه علوم عصبی، نقشی جدید برای مسیر نوروکینین-۱ رسپتور (Neurokinin1 receptor=NK1R) و لیگاند آن Substance P در پاتوژنز سرطان‌ها تعریف کرده‌اند (۴). مطالعات نشان داده که اتصال Substance P به گیرنده نوروکینین-۱ علاوه بر تنظیم بسیاری از اعمال فیزیولوژیک مرتبط با سیستم عصبی مرکزی و محیطی، قادر است تا با هدف قرار دادن طیف وسیعی از مولکول‌ها و مسیرهای انتقال پیام زیردست همچون (PI3K=phosphatidylinositide 3-kinases) و (MAPK=Mitogen-Activated Protein kinases) در پاتوژنز سرطان‌ها ایفای نقش کند (۶و۵). همچنین مطالعات بسیاری بر انواع بدخیمی‌های انسانی از جمله گیلوبلاستوما، رتینوبلاستوما و سرطان‌های پانکراس، کلون، ریه و لوسمی نیز صراحتاً به وجود ارتباط بین این مسیر و پاتوژنز سرطان‌ها اشاره کرده‌اند (۹-۷). از سوی دیگر، بررسی‌های صورت گرفته بر بلاست‌های بدخیم میلوئیدی نیز نشان داده‌اند که میزان بیان NK1R نسبت به بلاست‌های نرمال افزایش قابل توجهی دارد که خود موید تأثیر مسیر NK1R/SP بر لوسمی میلوئیدی حاد می‌باشد (۱۰). در حال حاضر استفاده از بسیاری از مهارکنندگان NK1R در درمان بدخیمی‌های انسانی به شدت مورد توجه قرار گرفته است. اپرپیتانت یکی از مهم‌ترین مهارکنندگان NK1R با میل ترکیبی بسیار بالا است که در حال حاضر به عنوان داروی ضدتهوع و استفراغ در کنار بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). عدم سمیت این مهارکننده توسط FDA تأیید شده و مطالعات نشان می‌دهند که این دارو علاوه‌بر جلوگیری از تهوع و استفراغ ناشی از شیمی

▣ این مقاله حاصل پایان نامه الهام رازانی دانشجوی کارشناسی ارشد خون شناسی و بانک خون دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر داود بشّاش
آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون. تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۸۵۳۱
E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]

درمانی (chemotherapy-induced nausea and vomiting) دارای اثرات ضدتشنج، ضدمیگرن و ضدالتهاب نیز می‌باشد(۱۳و۱۲). مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی نشان دادند که اپرپیتانت قادر به جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی بوده و همچنین می‌تواند باعث القاء آپوپتوز نیز در این سلول‌ها گردد (۱۴). این دارو قادر به مهار اثرات نامطلوب ناشی ازNK1R/SP در مهاجرت سلولی، تکثیر و ممانعت از آپوپتوز می‌باشد (۱۵). بررسی‌های صورت گرفته نشان داده‌اند که مهار این مسیر توسط آنتاگونیست‌های NK1R در سرطان‌هایی نظیر سینه (۱۶)، هپاتوبلاستوما (۱۷) و ملانوما (۱۸) می‌تواند موثر و امیدبخش باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیوی داروی اپرپیتانت بر رده سلولی مشتق شده از APL می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلولی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) (انستیتو پاستور) در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. جهت اطمینان از صحت سلول‌های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RARα با استفاده از تکنیک RT-PCR برای این رده مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های مختلف اپرپیتانت (۵-۱ میکرومولار) و در زمان‌های ۲۴ و ۳۶ ساعت صورت گرفت. جهت جلوگیری از اثرات حلال روی میزان پرولیفراسیون و بقاء رده سلولی، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه‌گانه انجام شد.

آزمون بررسی میزان جذب سلولی تریپان‌بلو: به منظور بررسی تاثیر اپرپیتانت بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های NB4 به تعداد $۴/۵\times۱۰^{۵}$ cell/ml در حضور دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان‌بلو ۰/۴٪ مخلوط شده و تعداد سلول‌ها زیرمیکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفتند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه شد.

میزان زنده‌مانی (٪)=تعداد سلول‌های زنده ÷ تعداد کل سلول‌ها × (۱۰۰)

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay: جهت ارزیابی تاثیر اپرپیتانت بر فعالیت متابولیک سلول‌های NB4، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی (۵-۱ میکرومولار) و فاقد دارو اضافه و به مدت زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شد.

پس از گذشت زمان مورد نظر، به سلول‌های داخل پلیت محلول ۵ MTT mg/ml (سیگما، آمریکا) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور g ۱۰۰۰به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری: به منظور بررسی تاثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، ۵×۱۰^{۵} سلول در هرچاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۳۶ ساعت با غلظت‌های مختلف از اپرپیتانت تیمار گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات- سالین (PBS) و افزودن معرف‌های AnnexinV-FITC (Roche Applied Science، آلمان)، PI (Roche Applied Science، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (PartecPasIII، آلمان) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار FloMax 2.3 صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA: پس از تیمار سلول‌ها با اپرپیتانت با دوز ۵ میکرومولار و گذشت ۳۶ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و همچنین نمونه کنترل با استفاده از ترایزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه NanodropND2000 بررسی شد. جهت انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA (TAKARA، ژاپن) استفاده شد. جهت سنتز cDNA مطابق با بروشور کیت نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

بررسی کمّی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 دخیل در آپوپتوز: برای بررسی کمّی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 آزمون RT-PCR انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرومولار SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرومولار cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هریک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۷ میکرومولار آب مقطر عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله اتصال/بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می‌باشد. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت؛ همچنین محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز آماری: تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش-شده به شکل Mean±SD قید شدند. هم چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم‌افزار SPSS ۲۱ و GraphPad Prism7 استفاده شد

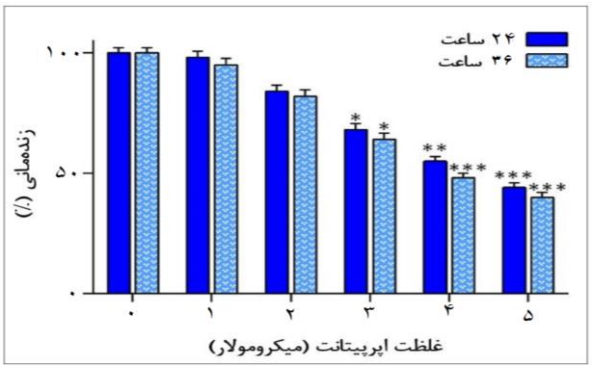
جدول۱. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمونReal Time Quantitative RT-PCR

ژن	Accession number	آغازگر معکوس (5' -3')	آغازگر مستقیم (5'-3')	سایز (bp)
HPRT	NM_000194	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	۱۱۱
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bcl-2	NM_000633	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	۲۴۹

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]

یافته‌ها

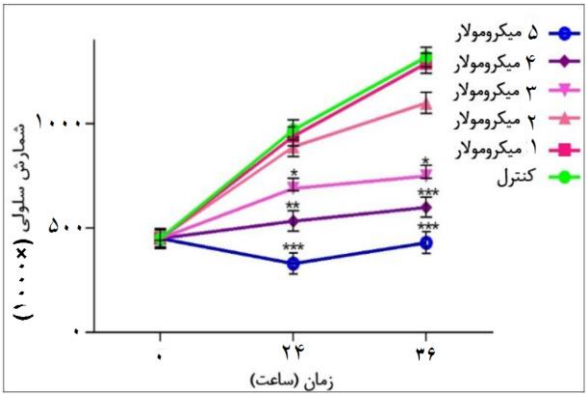
اپرپیتانت سبب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4 به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. نتایج نشان داد که با افزایش دوز دارو و گذشت زمان، میزان جذب رنگ تریپان‌بلو در سلول‌های NB4 افزایش می‌یابد که نشان‌گر کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مواجه با دارو است. نتایج مشخص کردند، علیرغم اینکه دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار اپرپیتانت اثر چشمگیری بر میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4 نمی‌گذارد؛ تیمار سلول‌ها با دوزهای بالاتر از این مهارکننده (۳، ۴ و ۵ میکرومولار) و در طی ۳۶ ساعت میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به ترتیب به میزان ۳۶، ۵۲ و ۶۰ درصد کاهش می‌دهد ($p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۰۱$)(نمودار ۱).



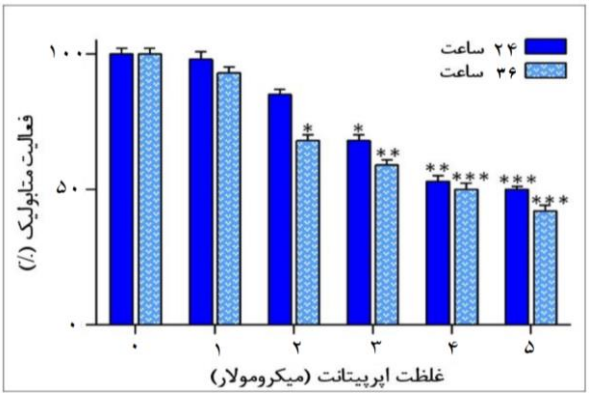
نمودار ۱. تاثیر داروی اپرپیتانت بر میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4. سلول‌ها با دوزهای مختلف اپرپیتانت تیمار شدند، سپس میزان زنده‌مانی سلول‌ها بوسیله آزمون تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean±SD) محاسبه و p به دست آمده (* $p<۰/۰۵$، ** $p<۰/۰۱$ و *** $p<۰/۰۰۱$) نشان‌گر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

تیمار سلول‌های NB4 با اپرپیتانت منجر به کاهش تکثیر سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود: در مقایسه با گروه کنترل، تیمار سلول‌ها با دوزهای مختلف اپرپیتانت باعث شد تا شمار سلول‌های زنده به صورت معنی‌داری کاهش یابد. در تائید با نتایج به دست آمده در بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها، همچنان که دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار از مهارکننده NK1R قادر به اعمال اثر ضدتکثیری بر رده سلولی NB4 نمی‌باشد، تیمار سلول‌ها با دوزهای بالاتر این مهارکننده از تکثیر سلول‌ها نیز جلوگیری می‌نماید؛ به طوریکه اپرپیتانت در دوز 5 میکرومولار در مدت زمان ۳۶ ساعت بیش‌ترین اثر مهاری را بر روی سلول‌های NB4 می‌گذارد ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲).

اپرپیتانت فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 را بصورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد: نتایج بدست آمده از آزمون MTT نشان داد که مهار NK1R توسط اپرپیتانت، منجر به کاهش وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیکی سلول-های NB4 می‌گردد. تیمار سلول‌ها با بالاترین دوز دارو (۵ میکرومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان ۵۰٪ ($p<۰/۰۰۱$) کاهش داد (نمودار ۳). به‌علاوه، اثر مهاری با گذشت زمان بیش‌تر نیز می‌شود؛ به طوریکه پس از گذشت ۳۶ ساعت از تیمار سلول‌ها با دوز ۵ میکرومولار این مهارکننده، فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به میزان ۵۸٪ کاهش می‌یابد ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۳).



نمودار ۲. تاثیر اپرپیتانت بر شمارش سلولی در سلول‌های NB4 به‌صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های NB4 به تعداد $۴/۵\times۱۰^۵$ با غلظت‌های ۱ تا ۵ میکرومولار از اپرپیتانت تیمار شدند. میانگین و انحراف‌معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean±SD) محاسبه و p به دست آمده (* $p<۰/۰۵$، ** $p<۰/۰۱$ و *** $p<۰/۰۰۱$) نشان‌گر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

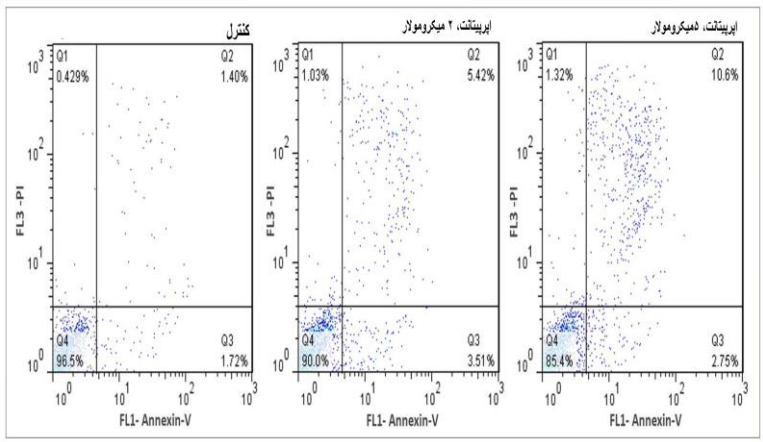


نمودار ۳. بررسی تاثیر اپرپیتانت بر فعالیت متابولیک سلولی NB4. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean±SD) محاسبه و p-value به دست آمده (* $p<۰/۰۵$، ** $p<۰/۰۱$ و *** $p<۰/۰۰۱$) نشانگر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

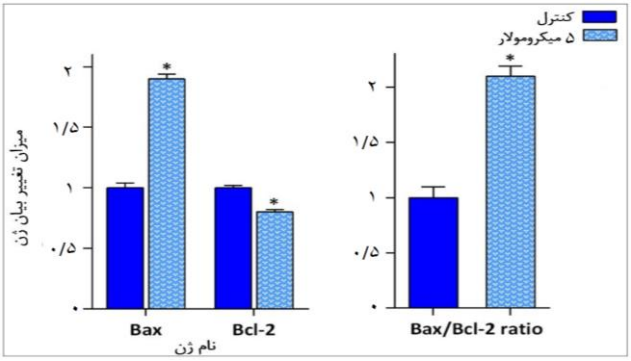
اپرپیتانت منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود: نتایج فلوسایتومتری حاکی از آن است که اپرپیتانت به طور قابل ملاحظه‌ای سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود. این دارو قادر است در دوز ۵ میکرومولار درصد سلولهای آنکسین PI/V مثبت را به میزان ۱۰/۶٪ افزایش دهد ($p\leq۰/۰۱$) (نمودار ۴).

افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 به دنبال تیمار رده سلولی NB4 با اپرپیتانت: نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های NB4 با اپرپیتانت با افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 همراه می‌باشد (نمودار ۴). به دلیل افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول‌های مواجه‌شده با دوز ۵ میکرومولار نسبت به سلول‌های کنترل با افزایش همراه بوده که این مسئله نیز با افزایش میزان آپوپتوز خود را نشان داده است (نمودار ۵).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]



نمودار ۴. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوز شده پس از تیمار با دوزهای مختلف اپرپیتانت. تیمار سلول‌های NB4 با این مهار کننده NK1R باعث افزایش درصد جمعیت سلول‌های آنکسین PI/V مثبت می‌شود.



نمودار ۵. افزایش میزان فعالیت رونویسی از ژن پروآپوپتوتیک Bax و همچنین کاهش سطح mRNA ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 در طی تیمار ۳۶ ساعته سلول‌های NB4 با دوز ۵ میکرومولار اپرپیتانت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean±SD) محاسبه و p به دست آمده (*p<۰/۰۵) نشانگر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهند که تیمار سلول‌های NB4 با مهارکننده NK1R منجر به کاهش درصد زنده‌مانی، میزان تکثیر و همچنین فعالیت متابولیک سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. علی‌رغم عدم وجود اثرات کشندگی قابل توجه در دوزهای پایین و بازه زمانی کوتاه، با افزایش دوز و زمان مواجه سلول‌ها با اپرپیتانت، اثر کشندگی دارو به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد؛ به طوریکه تیمار ۳۶ ساعته با دوز ۵ میکرومولار از این مهارکننده قادر است میزان بقاء سلول‌های NB4 را بیش از ۵۰٪ کاهش دهد. مشابه با نتایج به دست آمده، Munoz و همکارانش نیز مشخص کرده‌اند که مهارکننده NK1R قادر است از اثر میتوژنیک Substance P بر رده سلولی Hep-G2 بکاهد و بدین ترتیب از میزان تکثیر و همچنین زنده‌مانی این سلول‌ها جلوگیری کند (۱۹). در مطالعه دیگری که بر رده سلول‌های ملانومایی نیز انجام شده بود، مشخص گردید که اپرپیتانت در غلظت‌های بین ۱۰ تا ۶۰ میکرومولار قادر به کاهش میزان رشد سلول‌های میلومایی می‌باشد (۱۸). از این مقایسه می‌توان فهمید که تأثیرگذاری این دارو روی سلول‌های APL نسبت به سلول‌های ملانومایی بیشتر است که احتمالا به دلیل ماهیت متفاوت این دو سلول و اختلاف آن‌ها در میزان بیان NK1R می‌باشد. از سوی دیگر دو مطالعه دیگری که بر رده‌های سلولی مختلفی صورت گرفته‌اند نشان دادند که حتی غلظت‌های بالای اپرپیتانت اثر کشندگی برای سلول‌های نرمال ندارد. Berger و همکارانش نشان دادند که علیرغم آنکه غلظت‌های بالا اپرپیتانت قادر به القاء اثرات کشندگی در سلول‌های بدخیم هستند، این دارو تا غلظت ۴۰ میکرومولار قادر به القاء مرگ سلولی در سلول‌های فیبروبلاست نمی‌باشد (۱۷).

در مطالعه دیگری که توسط Munoz و همکارانش صورت گرفته نیز گزارش شد که اپرپیتانت در غلظت‌های بیش از ۹۰ میکرومولار قادر به کاهش میزان بقاء سلول‌های نرمال امبریونیک کلیوی (HEK cells) می‌شود (۲۰). از نتایج هر دو بررسی می‌توان این گونه استنباط کرد که غلظت اپرپیتانت به کار رفته در این پژوهش هیچ اثر کشندگی برای سلول‌های سالم ندارد. در نتیجه می‌توان امیدوار بود که نتایج به دست آمده از پژوهش فعلی به دلیل تأثیرگذاری روی سلول‌های توموری بتوانند پس از بررسی بیشتر در آزمایشات بالینی مورد استفاده قرار گیرند. تاکنون مکانیسم‌های مختلفی در پاتوژنز سرطان‌ها مطرح شده است که در بین آن‌ها فرار از آپوپتوز یکی از مهم‌ترین سازوکارها می‌باشد. برهم خوردن تعادل بیان پروتئین‌های پیش‌برنده آپوپتوز و پروتئین‌های مهارکننده این پدیده از طریق افزایش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک به ژن‌های پروآپوپتوتیک یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین راه‌کارهای فرار از آپوپتوز شناخته شده است (۲۲و۲۱). مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت بیش از حد مسیر NK1R در سلول‌های سرطانی می‌تواند با تاثیرگذاشتن و فعال کردن طیف وسیعی از مولکول‌ها و مسیرهای زیردست باعث جلوگیری از پدیده آپوپتوز گردد (۲۳).

در این مطالعه تیمار سلول‌های مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیت حاد با آنتاگونیست NK1R، اپرپیتانت نه تنها منجر به القاء آپوپتوز در این رده سلولی شد؛ بلکه این دارو با افزایش میزان فعالیت رونویسی ژن‌های پرو و آنتی آپوپتوتیک خانواده Bcl-2، تعادل پروتئین‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز را تغییر داد و به این ترتیب اثر سایتوتوکسیک خود را در سلول‌های NB4 اعمال نمود. در همین راستا، مطالعه دیگری نیز نشان داده است که مهار مسیر NK1R توسط اپرپیتانت ، منجر به القاء آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌شود (۲۴). مشابه این یافته، در سلول‌های تومور توپر سرطان سینه نیز به دست آمده است. Munoz و همکارانش نشان دادند که اپرپیتانت می‌تواند منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه نیز شود (۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد که اپرپیتانت احتمالاً با تغییر فعالیت رونویسی ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک خانواده Bcl-2 منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های APL می‌شود و بدین ترتیب از میزان بقاء و تکثیر این سلول‌ها می‌کاهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که شرایط انجام این پژوهش را فراهم کردند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]

Anti-Cancer Effect of Aprepitant on Nb4 Leukemic Cells

E. Razani (MSc)[1], S. Bayati (PhD)[2], A. Safaroghli Azar (MSc)[1], D. Bashash (PhD)*[3], S.H. Ghaffari (PhD)[4]

1.Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
2.Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
3.Department of Hematology and Blood Bank, Facuty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
4.Hematology-Oncology and Stem Cell Research Center, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(10); Oct 2017; PP: 28-34
Received: Mar 17th 2017, Revised: Jun 10th 2017, Accepted: Jul 21th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Genetic studies have demonstrated that the neurokini-1 Receptor (NK1R)is frequently involved in the pathogenesis of wide assortment of human malignancies, including acute promyelocytic leukemia (APL). The activity of this pathway in leukemic cells results in an excessive cell proliferation and evade from apoptosis. In this study, we aimed to investigate the effect of Aprepitant (NK1R antagonist) on the survival rate of APL cells.

METHODS: This experimental study is conducted on APL-derived NB4 cells (Institute Pasteur). To determine the anti-tumor effect of Aprepitant, NB4 cells were divided into 6 groups: control and 1-, 2-, 3-, 4- and 5 µM-drug treated groups. Then the cell viability, metabolic activity, induction of apoptosis and transcriptional alteration of Bax and Bcl-2 genes were investigated after 24 and 36 h treatment using trypan blue assay, MTT assay, Annexin-V/PI staining and RQ-PCR analysis, respectively.

FINDINGS: 36 h treatment with the highest concentration of Aprepitant (5 µM) resulted in an approximately 50% reduction in the viability (assessed by trypan blue) and metabolic activity (assessed by MTT assay) of NB4 cells ($p<0.001$) in comparison with control group. Moreover, Aprepitant is able to increase the proportion apoptotic cells from 1.4% in control group to 10.6% in 5 µM drug-treated cells though up-regulating Bax/Bcl-2 molecular ratio ($p\leq0.05$).

CONCLUSION: Aprepitant exerted both cytotoxic and anti-proliferative effects in NB4 cells.

KEY WORDS: *Acute promyelocytic leukemia, Apoptosis, Aprepitant, NB4 cell line*.

Please cite this article as follows:

Razani E, Bayati S, Safaroghli Azar A, Bashash D, Ghaffari SH. Anti-Cancer Effect of Aprepitant on Nb4 Leukemic Cells. J Babol Univ Med Sci. 2017; 19(10):28-34.

* **Corresponding author: D. Bashash (PhD)**
Address: Department of Hematology and Blood Bank, Facuty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 22718531
E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]

References

1.Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. Blood. 2016;127(1):29-41.

2.Rogaia D, Grignani F, Grignani F, Nicoletti I, Pelicci PG. The acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein reduces the frequency of commitment to apoptosis upon growth factor deprivation of GM-CSF-dependent myeloid cells. Leukemia. 1995;9(9):1467-72.

3.Wu J1, Wong WW, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. Cancer Res. 2004;64(18):6461-8.

4.Esteban F1, Muñoz M, González-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. Cancer Metastasis Rev. 2006;25(1):137-45.

5.Weihua Luo, Taraneh R. Mohammed Sharif. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Cancer Res. 1996;56(21):4983-91.

6.DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. β-arrestin–dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. J Cell Biol. 2000;148(6):1267-82.

7.Muñoz M, González-Ortega A, Rosso M, Robles-Frias MJ, Carranza A, Salinas-Martín MV, Coveñas R. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. Peptides. 2012;38(2):318-25.

8.Muñoz M, González-OrtegaRafael C. The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. Invest New Drug. 2012;30(2):529-40.

9.Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. Peptides. 2013;48:1-9.

10.Giorgio'Correspondence R, Giorgio R, Tazzari PL, Barbara G, Stanghellini V, Corinaldesi R. Detection of substance P immunoreactivity in human peripheral leukocytes. J Neuroimmunol. 1998;82(2):175-81.

11.Hargreaves R, Arjona Ferreira JC, Hughes D, Brands J, Hale J, Britta M. Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Ann NY Acad Sci. 2011;1222(1):40-8.

12.Hesketh PJ, Grunberg SM, Gralla RJ, Warr DG, Roila F, Wit Rd. The oral neurokinin-1 antagonist aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients receiving high-dose cisplatin—the aprepitant protocol 052 study group. J Clin Oncol. 2003;21(22):4112-9.

13.Muñoz M, Coveñas R. Neurokinin-1 receptor antagonists as antitumor drugs in gastrointestinal cancer: A new approach. Saudi J Gastroenterol. 2016;22(4):260.

14.Kast RE, Ramiro S, Lladó S, Toro S, Coveñas R, Muñoz M. Antitumor action of temozolomide, ritonavir and aprepitant against human glioma cells. J Neuro-Oncol. 2016;126(3):425-31.

15.Munoz M, Rosso M, Covenas R. The NK-1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on human pancreatic cancer cell lines. Lett Drug Des Disc. 2006;3(5):323-9.

16.Muñoz M, Berger M, Rosso M, Gonzalez-Ortega A. Andrés carranza rafael coveñas antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. Int J Oncol. 2014;44(1):137-46.

17.Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A, Salinas-Martín MV, de Agustín Asencio JC. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. J Hepatol. 2014;60(5):985-94.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]

18.Muñoz M, Rosso M, José Robles-Frias M, Vicente Salinas-Martín M, Rosso R, González-Ortega A. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. Lab Invest. 2010;90(8):1259-69.

19.Muñoz M, Marisa R, Aguilaret FJ, Esteban F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEp-2. Invest New drug. 2008;26(2):111-8.

20. Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. Invest New Drugs. 2010;28(2):187-93.

21.Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267(5203):1456.

22.Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. Exp Cell Res. 1999;248(1):30-43.

23.DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM ,Nishijima D, Déry O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a β-arrestin-dependent scaffolding complex. Proc Nat Acad Sci. 2000,97(20):11086-91.

24.Bayati S, Bashash D, Ahmadian S, Safaroghli-Azar A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Inhibition of tachykinin NK 1 receptor using aprepitant induces apoptotic cell death and G1 arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. Eur J Pharmacol. 2016;791:274-83.

25.Muñoz M, González-Ortega A, Salinas-Martín MV, Carranza A, Garcia-Recio S, Almendro V. The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. Int J Oncol. 2014;45(4):1658-72.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.10.4.3]