

اثر ضدسرطانی اپریتانت بر رده سلولی لوسمیک NB4

الهام رازانی (MSc)^۱، سمانه بیاتی (PhD)^۲، آوا صفراوغلی آذر (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 اپریتانت (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 انستیتو پاستور تهیه گردید، انجام شد. به منظور بررسی اثر ضدتوموری اپریتانت، 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 اپریتانت (۵ میکرومولار)، درصد زنده‌مانی (ارزیابی شده توسط تریپان‌بلو) و فعالیت متابولیک سلول‌ها (ارزیابی شده توسط MTT assay) را به بیش از ۵۰٪ ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. همچنین اپریتانت جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک را از ۱/۴٪ در گروه کنترل به ۱۰/۶٪ در گروه تیمار شده با دوز ۵ میکرومولار افزایش داد ($p < 0.05$) و آپوپتوز را از طریق افزایش دو برابری نسبت بیان Bax/Bcl-2 فعال نمود ($p < 0.05$).

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

واژه‌های کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آپوپتوز، اپریتانت، 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 زبردست همچون (PI3K=phosphatidylinositol 3-kinases) و (MAPK=Mitogen-Activated Protein kinases) در پاتوژنز سرطان‌ها

ایفای نقش کند (۵). همچنین مطالعات بسیاری بر انواع بدخیمی‌های انسانی از جمله گلیوبلاستوما، رتینوبلاستوما و سرطان‌های پانکراس، کولون، ریه و لوسمی نیز صراحتاً به وجود ارتباط بین این مسیر و پاتوژنز سرطان‌ها اشاره کرده‌اند (۶-۹). 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. اپریتانت 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 علاوه بر 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 بشاش

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون. تلفن: ۰۲۱-۲۳۷۱۸۵۳۱

E-mail: d.bashash@sbm.ac.ir

قرار گرفت. سپس پلیت با دور ۱۰۰۰ g به 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 فلوسایتومتري: به منظور بررسی تاثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده، 5×10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه ای ریخته شد و به مدت ۳۶ ساعت با غلظت های مختلف از اپریتانت تیمار گردید. پس از شست و شوی سلول ها با بافر فسفات- سالین (PBS) و افزودن معرف های AnnexinV-FITC (Roche Applied Science، آلمان)، PI (Roche Applied Science، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (PartecPasIII، آلمان) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار FloMax 2.3 صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA: پس از تیمار سلول ها با اپریتانت با دوز ۵ میکرومولار و گذشت ۳۶ ساعت، استخراج RNA از سلول های تیمار شده و همچنین نمونه کنترل با استفاده از تریزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش اسپکتروفتومتري 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 نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

بررسی کمی بیان ژن های Bax و Bcl-2 دخیل در آپوپتوز: برای بررسی کمی بیان ژن های Bax و Bcl-2 آزمون RT-PCR انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرومولار SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرومولار cDNA، ۵/۰ 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 سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی گراد) و مرحله اتصال/بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می باشد. 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ قید شدند. هم چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم افزار SPSS ۲۱ و GraphPad Prism7 استفاده شد

درمانی (chemotherapy-induced nausea and vomiting) دارای اثرات ضد تشنج، ضد میگرن و ضد التهاب نیز می باشد (۱۳ و ۱۲). مطالعات بر روی سلول های سرطانی نشان دادند که اپریتانت قادر به جلوگیری از تکثیر سلول های سرطانی بوده و همچنین می تواند باعث القاء آپوپتوز نیز در این سلول ها گردد (۱۴). این دارو قادر به مهار اثرات نامطلوب ناشی از NK1R/SP در مهاجرت سلولی، تکثیر و ممانعت از آپوپتوز می باشد (۱۵). بررسی های صورت گرفته نشان داده اند که مهار این مسیر توسط آنتاگونیست های NK1R در سرطان های نظیر سینه (۱۶)، هپاتوبلاستوما (۱۷) و ملانوما (۱۸) می تواند موثر و امیدبخش باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیک و آنتی پرولیفراتیوی داروی اپریتانت بر رده سلولی مشتق شده از APL می باشد.

مواد و روش ها

کشت و تیمار سلولی: در این مطالعه تجربی، سلول های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) (انستیتو پاستور) در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و فشار دی اکسید کربن ۵٪ نگهداری شدند. جهت اطمینان از صحت سلول های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RARα با استفاده از تکنیک RT-PCR برای این رده مورد بررسی قرار گرفت. تیمار سلول های NB4 با غلظت های مختلف اپریتانت (۱-۵ میکرومولار) و در زمان های ۲۴ و ۳۶ ساعت صورت گرفت. جهت جلوگیری از اثرات حلال روی میزان پرولیفراسیون و بقاء رده سلولی، سلول ها با غلظت مشخص شده ای از DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه گانه انجام شد.

آزمون بررسی میزان جذب سلولی تریپان بلو: به منظور بررسی تاثیر اپریتانت بر میزان زنده ماندی سلول ها، سلول های NB4 به تعداد 4×10^5 cell/ml در حضور دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط شده و تعداد سلول ها زیر میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفتند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده ماندی سلول ها محاسبه شد.

$$\text{میزان زنده ماندی (\%)} = \frac{\text{تعداد سلول های زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times (100)$$

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

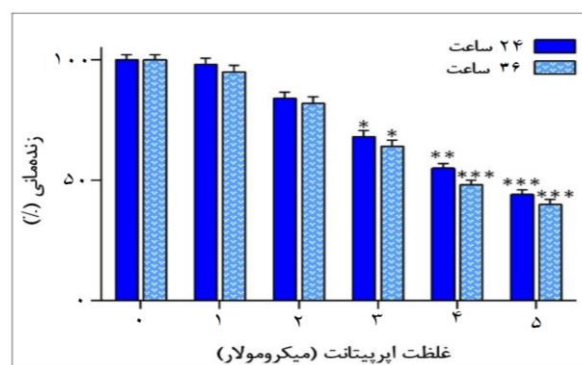
پس از گذشت زمان مورد نظر، به سلول های داخل پلیت محلول ۵ MTT mg/ml (سیگما، آمریکا) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

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

یافته‌ها

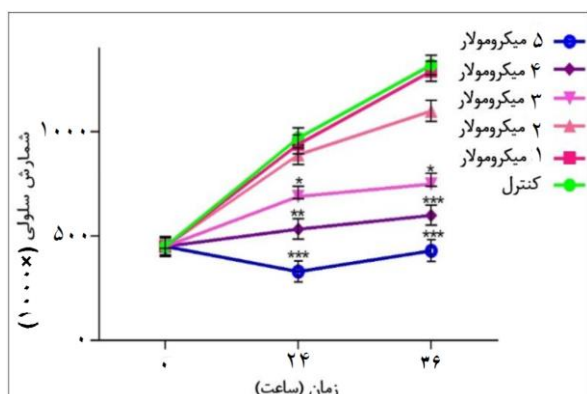
اپریتانت سبب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4 به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. نتایج نشان داد که با افزایش دوز دارو و گذشت زمان، میزان جذب رنگ تریپان‌بلو در سلول‌های NB4 افزایش می‌یابد که نشان‌گر کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مواجهه با دارو است. نتایج مشخص کردند، علیرغم اینکه دوزهای ۱ و ۲ میکرومولار اپریتانت 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 ۵۲، ۳۶ و ۶۰ درصد کاهش می‌دهد ($p < 0.05$ و $p < 0.001$) (نمودار ۱).



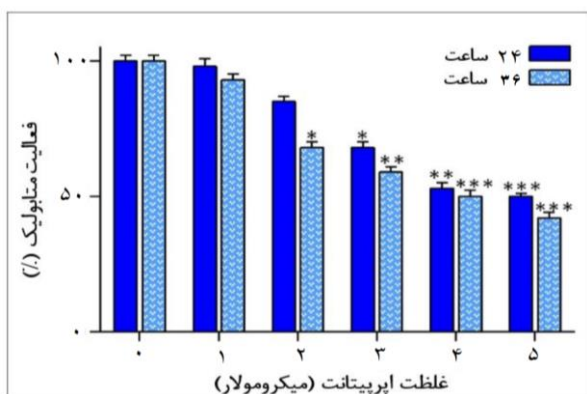
نمودار ۱. تاثیر داروی اپریتانت بر میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4. سلول‌ها با دوزهای مختلف اپریتانت تیمار شدند، سپس میزان زنده‌مانی سلول‌ها بوسیله آزمون تریپان‌بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($Mean \pm SD$) محاسبه و p به دست آمده ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$) نشان‌گر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

تیمار سلول‌های NB4 با اپریتانت منجر به کاهش تکثیر سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود؛ در مقایسه با گروه کنترل، تیمار سلول‌ها با دوزهای مختلف اپریتانت باعث شد تا شمار سلول‌های زنده به صورت معنی‌داری کاهش یابد. در تأیید 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 اپریتانت در دوز ۵ میکرومولار در مدت زمان ۳۶ ساعت بیش‌ترین اثر مهاری را بر روی سلول‌های NB4 می‌گذارد ($p < 0.001$) (نمودار ۲).

اپریتانت 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 اپریتانت، منجر به کاهش وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیکی سلول‌های NB4 می‌گردد. تیمار سلول‌ها با بالاترین دوز دارو (۵ میکرومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان ۵۰٪ ($p < 0.001$) کاهش داد (نمودار ۳). به علاوه، 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 ($p < 0.001$) (نمودار ۳).



نمودار ۲. تاثیر اپریتانت بر شمارش سلولی در سلول‌های NB4 به‌صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های NB4 به تعداد $4/5 \times 10^5$ با غلظت‌های ۱ تا ۵ میکرومولار از اپریتانت تیمار شدند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($Mean \pm SD$) محاسبه و p به دست آمده ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$) نشان‌گر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



نمودار ۳. بررسی تاثیر اپریتانت بر فعالیت متابولیک سلولی NB4. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($Mean \pm SD$) محاسبه و p -value به دست آمده ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$) نشانگر معنی دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

اپریتانت منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های NB4 می‌شود؛ نتایج فلوسایتومتری حاکی از آن است که اپریتانت 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 ($p \leq 0.01$) (نمودار ۴).

افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 به دنبال تیمار رده سلولی NB4 با اپریتانت؛ نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های NB4 با اپریتانت با افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 همراه می‌باشد (نمودار ۴). به دلیل افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول‌های مواجهه‌شده 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).

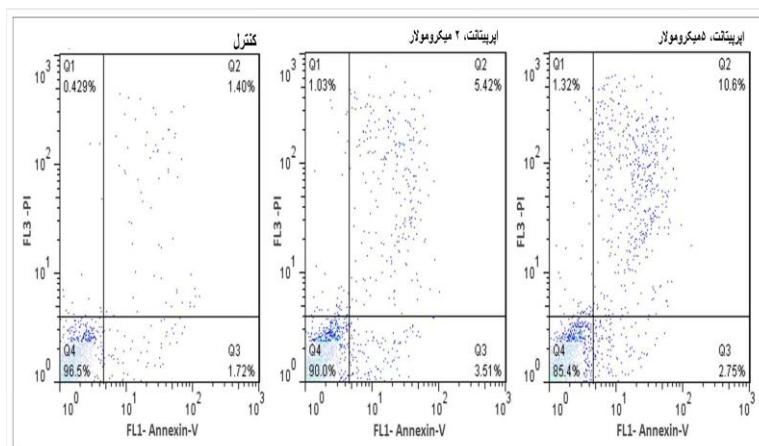
کاهش میزان رشد سلول‌های میلومایی می‌باشد (۱۸). از این مقایسه می‌توان فهمید که تأثیرگذاری این دارو روی سلول‌های APL نسبت به سلول‌های ملانومایی بیشتر است که احتمالاً به دلیل ماهیت متفاوت این دو سلول و اختلاف آن‌ها در میزان بیان NK1R می‌باشد. از سوی دیگر دو مطالعه دیگری که بر رده‌های سلولی مختلفی صورت گرفته‌اند نشان دادند که حتی غلظت‌های بالای اپریتانت اثر کشندگی برای سلول‌های نرمال ندارد. Berger و همکارانش نشان دادند که علی‌رغم آنکه غلظت‌های بالا اپریتانت 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 اپریتانت 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 اپریتانت 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 (۲۱ و ۲۲). مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت بیش از حد مسیر NK1R در سلول‌های سرطانی می‌تواند با تأثیر گذاشتن و فعال کردن طیف وسیعی از مولکول‌ها و مسیرهای زیردست باعث جلوگیری از پدیده آپوپتوز گردد (۲۳).

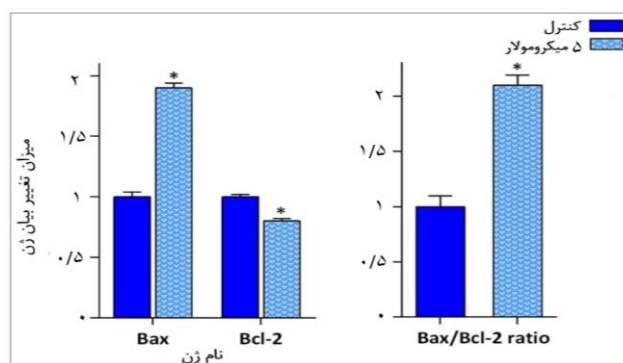
در این مطالعه تیمار سلول‌های مشتق شده از لوسمی پرومیلوسیت حاد با آنتاگونیست NK1R، اپریتانت نه تنها منجر به القاء آپوپتوز در این رده سلولی شد؛ بلکه این دارو با افزایش میزان فعالیت رونویسی ژن‌های پرو و آنتی آپوپتوتیک خانواده Bcl-2، تعادل پروتئین‌های درگیر در فرایند آپوپتوز را تغییر داد و به این ترتیب اثر سایتوتوکسیک خود را در سلول‌های NB4 اعمال نمود. در همین راستا، مطالعه دیگری نیز نشان داده است که مهار مسیر NK1R توسط اپریتانت، 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 اپریتانت می‌تواند منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینه نیز شود (۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد که اپریتانت 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 می‌گردد.



نمودار ۴. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوز شده پس از تیمار با دوزهای مختلف اپریتانت. 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 اپریتانت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean±SD) محاسبه و p به دست آمده ($p < 0.05$) 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 اپریتانت، 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 اپریتانت در غلظت‌های بین ۱۰ تا ۶۰ میکرومولار قادر به

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, Faculty 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 μ M-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 μ M) 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 μ M drug-treated cells though up-regulating Bax/Bcl-2 molecular ratio ($p \leq 0.05$).

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, Faculty 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

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-Ortega Rafael 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.

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.