مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۸/هفته چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۲۰

اثرات داروهای ضد التهابی ایبوپروفن و ایندومتاسین بر رده‌ی سلولی لوسمی میلوئیدی مزمن K562 در شرایط آزمایشگاهی

افسانه باپیری[۱]، دکتر مهدی محمدزاده[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در اغلب سرطان‌ها، میزان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ (COX-2) به واسطه‌ی دخالت در سنتز پروستاگلاندین‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین، مهار COX-2 می‌تواند نقش مؤثری در درمان سرطان ایفا کند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر داروهای ضد التهابی ایبوپروفن و ایندومتاسین بر رشد و تکثیر رده‌ی سلولی K562 بود.

روش‌ها: ابتدا، سلول‌های K562 کشت داده شد. سپس، سلول‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف ایبوپروفن و ایندومتاسین مورد تیمار قرار گرفتند. خصوصیت ضد توموری داروها بر سلول‌های K562 بعد از ۷۲ ساعت، با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] در سه تکرار سنجیده شد. جهت مطالعه‌ی آپوپتوز از الکتروفورز DNA و رنگ‌آمیزی DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) استفاده گردید.

یافته‌ها: ایبوپروفن و ایندومتاسین دارای خاصیت ضد توموری بر روی سلول‌های K562 بودند و این اثر با افزایش زمان و غلظت افزایش یافت؛ به طوری که، در غلظت‌های بالاتر و ۷۲ ساعت بعد از تیمار، شاهد بیشترین اثرات مهاری داروها بودیم. بررسی‌های آماری نشان داد که هر دو دارو به طور معنی‌داری قادر هستند، رشد رده‌ی K562 را مهار سازند ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های ما، اثرات ضد توموری ایبوپروفن و ایندومتاسین در پیشگیری و درمان لوسمی میلوئید مزمن مؤثر است؛ اما نیاز به بررسی‌های بیشتر بنیادی و بالینی وجود دارد.

واژگان کلیدی: داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی، ایندومتاسین، ایبوپروفن، رده‌ی سلولی K562، خاصیت ضد توموری

ارجاع: باپیری افسانه، محمدزاده مهدی. **اثرات داروهای ضد التهابی ایبوپروفن و ایندومتاسین بر رده‌ی سلولی لوسمی میلوئیدی مزمن K562 در شرایط آزمایشگاهی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۸): ۳۹۹-۳۸۹

مقدمه

امروزه بیش از صد نوع مختلف سرطان در دنیا شناخته شده است که لوسمی یا سرطان خون یکی از انواع شایع و مهلک آن می باشد. لوسمی، سرطان بافت های خون ساز بدن شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی است که توسط گلبول‌های سفید خون و لنف به وجود می آید (۱). سرطان خون با توجه به منشأ سلولی به دو دسته‌ی میلوئیدی و لنفوئیدی و با توجه به سیر بیماری به مزمن و حاد تقسیم‌بندی می شود. بر این اساس، سرطان خون به چهار گروه لوسمی

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: افسانه باپیری
Email: afsanehbapiri@yahoo.com

لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia یا ALL)، لوسمی میلوئیدی حاد (AML یا Acute myeloid leukemia)، لوسمی لنفوبلاستیک مزمن (Chronic lymphoblastic leukemia یا CLL) و لوسمی میلوئیدی مزمن (CML یا Chronic myeloid leukemia) طبقه‌بندی می‌گردد (۲).

لوسمی میلوئیدی مزمن که ۱۵ تا ۲۰ درصد از انواع لوسمی‌ها را تشکیل می‌دهد، به دلیل یک جابه‌جایی دو طرفه بین ژن Ab1 بر روی کروموزوم ۹ و ژن BCR بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی خونی چند توان (Totipotent blood stem cells) ایجاد می‌شود (۳). انکوژن BCR-Ab1 حاصل از این جابه‌جایی، پروتئین p210Bcr-Ab1 را که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم می‌باشد، کد می‌کند. این پروتئین علاوه بر تکثیر بی‌رویه و مستقل از فاکتور رشد سلول‌های پیش‌ساز میلوئیدی، باعث اختلال در آپوپتوز آن‌ها نیز می‌گردد. تاکنون چهار رده ی سلولی از لوسمی میلوئیدی مزمن شناخته شده است که یکی از آن‌ها K562 می‌باشد. سلول‌های K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشأ میلوئیدی است که اولین بار در یک پیرزن ۵۳ ساله‌ی مبتلا به سرطان خون تشخیص داده شد. این رده ی سلولی به واسطه‌ی برخی ویژگی‌های خاص جهت تحقیقات آزمایشگاهی، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵-۴).

بر خلاف سایر انواع سرطان‌ها، لوسمی تومور جامد (Solid tumor) توپر نیست که پزشک بتواند با عمل جراحی آن را خارج نماید. در واقع مغز استخوان منبع این مشکل است، بنابراین درمان لوسمی بسیار پیچیده‌تر از سایر سرطان‌ها می‌باشد (۱). یکی از انواع درمان‌هایی که امروزه برای مقابله با این سرطان انجام می‌گیرد، شیمی‌درمانی است. متداول‌ترین نوع درمان برای لوسمی بر حسب نوع آن ممکن است یک دارو یا ترکیبی از داروهای شیمیایی مختلف باشد. داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (Non-steroid anti inflammation drugs یا NSAIDs)، فعالیت ضد درد، تب‌بر و ضد التهابی را تحت تأثیر قرار می‌دهند که به طور وسیعی با توانایی این داروها در غیر فعالسازی آنزیم‌های سیکلواکسیژناز ۱ و ۲ (Cyclooxygenase 1, 2 یا COX-1 و COX-2) و آنزیم‌های مسؤول برای سنتز پروستاگلاندین‌ها در ارتباط هستند (۶).

نتایج مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است که NSAIDs می‌توانند با فعالیت شیمی‌درمانی امیدوار کننده به خصوص برای درمان سرطان روده و با مهار بیان میزان بالای COX-2، مورد توجه قرار گیرند (۷). یکی از مکانیسم های عملکردی این داروها، القای آپوپتوز و مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد (۷). اساس فارماکولوژی برای فعالیت‌های بازدارنده‌ی سرطان و ضد توموری این داروها ممکن است مهار COX-2 باشد؛ چرا که پروستاگلاندین های تولید شده توسط COX-2 می توانند تهاجم، آنژیوژنز تومور و پیشرفت در سرطان‌ها را افزایش دهند. این آنزیم می‌تواند در درمان بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان روده، سینه، پروستات، پانکراس، ریه، معده و تخمدان مورد هدف محققان قرار گیرد (۸).

نتایج پژوهش‌های محققان نشان می‌دهد که استفاده ی منظم از ایندومتاسین، باعث کاهش ۶۸-۶۱ درصدی سرطان ریه، کاهش رشد سلولی و تغییرات مورفولوژیک در آن‌ها می‌شود (۹). همچنین

ایندومتاسین، تقسیم سلول های لوسمی حاد HL60 را در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار کاهش می‌دهد و این اثر ناشی از کاهش میزان پروستاگلاندین E2 در محیط کشت می باشد (۱۰). بررسی‌های بعدی در این راستا حاکی از آن بود که مصرف نوع خوراکی داروی ایبوپروفن می‌تواند خطر سرطان سینه را به میزان ۴۳ درصد کاهش دهد (۱۱). بر این اساس، هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تأثیر داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی ایبوپروفن و ایندومتاسین بر رده ی سلول های اریتروميلوئیدی K562 بود.

روش‌ها

این مطالعه در آزمایشگاه کشت سلول (شرایط آزمایشگاهی) گروه زیست‌شناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه ارومیه و طی مراحل زیر در مدت زمان نزدیک به یک سال انجام شد.

تهیه‌ی سلول‌های سرطانی و کشت آن‌ها: رده‌ی سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (CI22) تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین + استرپتومایسین (Gibco, England) در انکوباتور (Memert, Germany) با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد (۱۲).

تهیه‌ی غلظت‌های مختلف ایندومتاسین و ایبوپروفن: جهت تهیه‌ی غلظت‌های مختلف ایندومتاسین و ایبوپروفن، ۲ میکرولیتر از داروهای ایبوپروفن و ایندومتاسین در ۱ میلی لیتر محیط کشت حل گردید. بدین ترتیب رقت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از ایبوپروفن و ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر از ایندومتاسین به دست آمد (۱۲).

سنجش خاصیت ضد توموری ایبوپروفن و ایندومتاسین با روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]: پس از سانتریفوژ (Sigma, Germany) و شمارش سلول‌های K562 به روش تریپان‌بلو (Trypan blue) (Merck, Germany)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی) (Gibco, England) به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۲ میکرولیتر از رقت‌های مختلف داروهای ایبوپروفن و ایندومتاسین به چاهک ها اضافه گردید. سه چاهک تنها دارای ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول بودند و به سه چاهک دیگر علاوه بر محیط کشت حاوی سلول، ۲ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) رقیق شده (۲ میکرولیتر DMSO در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت) نیز اضافه گردید و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در مرحله‌ی بعد، پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. این مراحل در سه روز تکرار شد.

پس از پایان زمان انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافر PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma, Germany) به تمامی چاهک‌ها افزوده، میکروپلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. در این مدت،

آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم محلول MTT را احیا کرده، آن را به ذرات نامحلول بنفش رنگ فورمازان تبدیل کرد. کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها، با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص به چاهک‌ها و قرار دادن پلیت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در Shaker انکوباتور (Biotek, South Korea)، حل شدند. در نهایت شدت نور جذب شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه Elisa reader (Stat Fax, USA) ثبت گردید. درصد سلول‌کشی دو داروی مذکور با فرمول زیر محاسبه گردید (۱۳):

۱۰۰ × [نور جذب شده‌ی گروه شاهد ÷ (نور جذب شده‌ی گروه شاهد- نور جذب شده‌ی نمونه)] = سلول‌کشی (درصد)

سنجش قطعه قطعه شدن DNA: قطعه قطعه شدن DNA بعد از استخراج آن از سلول‌ها اندازه‌گیری شد. تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در هر فلاسک با تیمارهای مختلف ریخته شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز [حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی‌مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)، ۵۰ میلی‌مولار Tris و ۰/۵ درصد SDS (Sodium dodecyl sulfate)، pH = ۸] و ۲۰۰ گرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K (Sigma, Germany) به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد. DNA با فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) استخراج شد. جهت رسوب DNA، اتانول خالص و نمک ۶ مولار افزوده شد و بعد از یک شبانه‌روز نگهداری در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، محتویات توسط بافر TE (Tris-EDTA) (شامل ۱۰ میلی‌مولار Tris و ۱۰ میلی‌مولار EDTA در pH = ۸) (Sigma, Germany) حل شد. DNA آماده شده توسط الکتروفورز (Bio Rad, America) در ژل ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید جداسازی شد و ژل مورد تصویربرداری قرار گرفت (۱۴).

رنگ‌آمیزی سلول‌های K562 با DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole): در ابتدا در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۵۰۰ هزار سلول ریخته شد و سپس با غلظت IC_{50} (Inhibitory concentration-50) (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد سلول‌ها را از بین می‌برد) داروهای ایبوپروفن و ایندومتاسین به مدت ۷۲ ساعت تیمار گردید. محتویات هر چاهک در میکروتیوب های جداگانه ریخته، با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر متانول بر روی رسوب سلولی ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سلول‌ها دوباره سانتریفوژ شد و روی رسوب ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS همراه با ۱ میکرولیتر رنگ DAPI (Sigma, Germany) رقیق شده (۱ میکرولیتر رنگ در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات PBS حل گردید) اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در فضای آزمایشگاه انکوبه شد. در مرحله ی آخر و بعد از اتمام انکوباسیون سلول‌های سانتریفوژ شده، رسوب با ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS مخلوط شد و از هر یک از محلول‌های سلولی یک قطره روی لام گذاشته و بر روی آن لامل قرار داده شد. محلول سلولی به دست آمده به عنوان نمونه با کمک میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss, Germany) فیلتردار

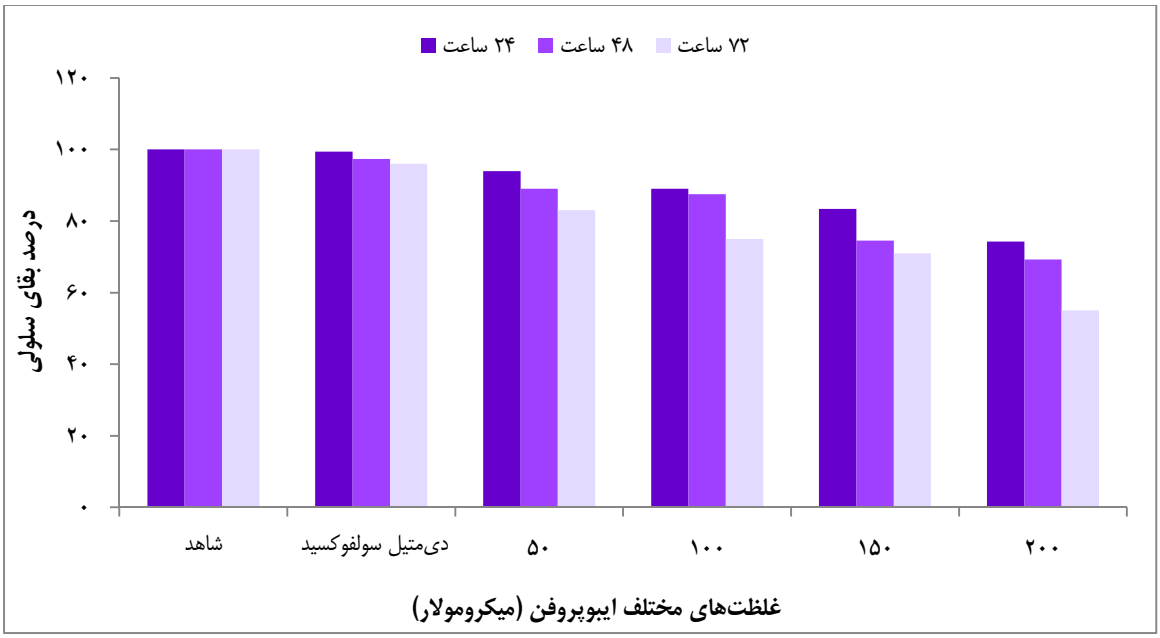
DAPI با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد ارزیابی و تصویربرداری قرار گرفت (۱۵).

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t استفاده شد و نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

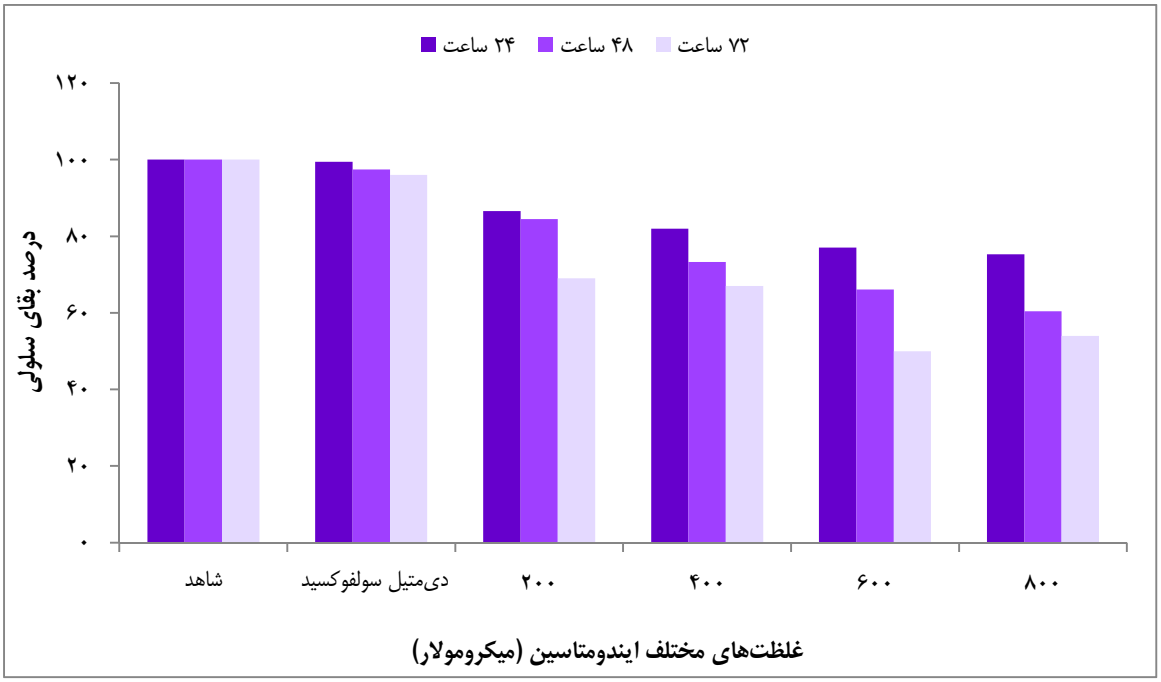
یافته‌ها

اثر ایبوپروفن بر روی تقسیم سلولی

داروهای ضد التهابی خطر پیشرفت سرطان‌های خاصی را کاهش می دهند. برای نمونه NSAIDs با کاهش التهاب مرتبط با تومور، منجر به کاهش خطر پیشرفت سرطان های کولون، سینه، ریه و پروستات می شوند (۸). در مطالعه ی حاضر جهت بررسی اثر داروی ضد التهابی غیر استروئیدی ایبوپروفن بر روی تقسیم سلولی K562، از روش MTT استفاده گردید. برای این منظور، سلول‌های K562 با ایبوپروفن در غلظت‌های مختلف به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. یافته‌ها حاکی از تأثیر ایبوپروفن بر کاهش رشد سلولی در مقایسه با نمونه‌ی شاهد بود و اثر این دارو بر رشد سلولی، به زمان و غلظت مصرفی دارو وابسته می باشد؛ به طوری که با افزایش غلظت و زمان، اثر بهتری مشاهده می شود. غلظت های مختلف ایبوپروفن در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به طور معنی داری موجب کاهش رشد سلولی شد ($P < ۰/۰۵$). بیشترین اثر در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر و در زمان ۷۲ ساعت مشاهده گردید که برابر با ۴۵ درصد کاهش رشد سلولی بود، اما درصد سلول کشی در ۲۴ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۶ و ۳۱ درصد بود (شکل ۱). همچنین IC_{50} ایبوپروفن برابر با ۳۱۵ میکرومولار محاسبه شد. لازم به ذکر است که غلظت ها در تمام مراحل آزمایش تنها با گروه شاهد مقایسه گردید.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف ایبوپروفن بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف ایندومتاسین بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار

اثر ایندومتاسین بر روی تقسیم سلولی

فعالیت ضد سرطانی داروهای ضد التهابی مانند آسپرین در بسیاری از سرطان ها مانند سرطان روده و لوسمی تأیید شده است (۶). بنابراین در مطالعه ی حاضر اثر مهاری ایندومتاسین بر روی رشد سلول سرطانی K562 بررسی گردید.

جهت تعیین اثر ایندومتاسین بر روی تقسیم سلول لوسمی، سلول های K562 با غلظت های مختلف ایندومتاسین کشت داده شدند. نتایج حاصل از روش MTT نشان داد که ایندومتاسین موجب مهار رشد سلولی (وابسته به زمان و غلظت) می‌شود (شکل ۲). کاهش ۴۶ درصدی رشد سلولی در غلظت ۸۰۰ میکرومولار بعد از ۷۲ ساعت تیمار مشاهده گردید؛ در حالی که درصد سلول‌کشی در همین غلظت در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۲۵ و ۴۰ درصد بود. IC_{50} ایندومتاسین نیز برابر با ۱۳۲۷ میکرومولار به دست آمد.

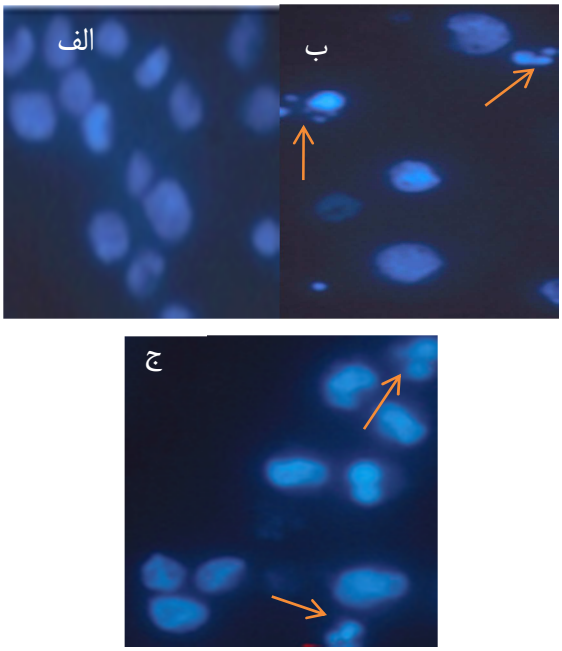
بررسی آپوپتوز توسط ایبوپروفن و ایندومتاسین

در طی فرایند آپوپتوز، کروماتین به قطعات کوچکی به نام الیگومر تبدیل می گردد (حدود ۱۸۰ جفت باز). این قطعات هنگام جداسازی به صورت باندهایی بر روی ژل ظاهر می‌شوند (۱۶).

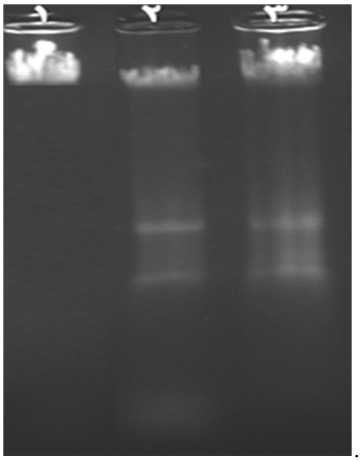
جهت بررسی آپوپتوز سلول‌های K562 با غلظت های IC_{50}، ایبوپروفن و ایندومتاسین به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می شود، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ‌آمیزی DAPI مشخص شد که در میان سلول های تیمار شده با ایبوپروفن و ایندومتاسین پس از گذشت ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های شاهد، سلول‌هایی با هسته‌ی قطعه قطعه شده وجود دارد که نشان دهنده‌ی مرگ سلولی از نوع آپوپتوز می‌باشد.

به منظور اثبات وقوع آپوپتوز از آزمون قطعه

شدن DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید؛ چرا که که قطعه قطعه شدن DNA یکی از مشخصه‌های مهم آپوپتوز می‌باشد. بر اساس نتایج، داروهای ایبوپروفن و ایندومتاسین باعث تغییر در الگوی ژنومی سلول های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول های شاهد (تیمار نشده) گردید (شکل ۴). DNA سلول‌های K562 تیمار شده بر روی ژل الکتروفورز حرکت می کنند؛ در حالی که این حالت در سلول های شاهد مشاهده نمی گردد. پس این آزمون در کنار داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنت نشان دهنده‌ی آن است که داروهای ضد التهابی مذکور از طریق آپوپتوز سبب القای مرگ در سلول‌های K562 می‌شوند.



شکل ۳. نمای میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های K562 رنگ‌آمیزی شده با DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) جهت بررسی آپوپتوز پس از ۷۲ ساعت
سلول‌های بدون تیمار (قسمت الف)، سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} از ایبوپروفن (قسمت ب) و سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} از ایندومتاسین (قسمت ج)



شکل ۴. بررسی قطعه قطعه شدن DNA سلول‌های K562 تحت تیمار غلظت‌های IC_{50} از ایبوپروفن و ایندومتاسین بعد از ۷۲ ساعت بر روی ژل الکتروفورز
چاهک ۱ = شاهد، چاهک ۲ = ایندومتاسین و چاهک ۳ = ایبوپروفن

بحث

بررسی های اپیدمیولوژی نشان داده است که حدود ۲۰ درصد از مرگ های ناشی از سرطان، با التهاب برطرف نشده و مزمن مرتبط است. التهاب و عفونت مزمن با تومورزایی در یک نفر از پنج بیمار مبتلا به سرطان در سراسر جهان ارتباط دارد (۸). مطالعات گزارش کرده‌اند که داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی از جمله آسپرین، ایبوپروفن، ایندومتاسین و... علاوه بر تسکین درد و کنترل التهاب، دارای اثرات ضد سرطانی و پیش آپوپتوز در انواع سلول های سرطانی می باشند (۱۷، ۱۵، ۱۳). با توجه به اهمیت داروهای ضد التهابی در جلوگیری از سرطان در مطالعه‌ی حاضر، اثر توکسیک غلظت‌های مختلف ایبوپروفن و ایندومتاسین بر رده‌ی سلولی K562 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج مطالعات حاکی از آن است که ایبوپروفن در سرطان روده و پروستات، باعث توقف چرخه‌ی

سلولی و افزایش تعداد سلول‌ها در فاز G0/G1 و کاهش تعداد سلول‌ها در فاز G2، M و S می‌شود. این دارو در دو مکانیسم، یکی مسیر مستقل از COX و دیگری مسیر وابسته به COX ایفای نقش می‌کند (۱۹-۱۸). Lim و همکاران به این نتیجه رسیدند که مصرف منظم آسپرین (دو بار در هفته به مدت یک ماه یا بیشتر)، خطر سرطان ریه را کاهش می دهد (۲۰). Nakanishi و همکاران در مطالعه‌ی خود مهارگرهای انتخابی COX-2 شامل NS-398 و Nabumetone را به ترتیب در غلظت‌های ۷۵ و ۳۵ میکرومولار روی دو رده‌ی سلولی لوسمی U-937 و ML-1 بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که این مهارگرها از طریق مهار COX-2، تقسیم سلولی را توسط القای توقف چرخه ی سلولی G0/G1 کاهش می‌دهند (۲۱).

ایبوپروفن و ناپروکسن برای بررسی اثرات بیولوژیک در سلول های کارسینومای روده‌ی انسانی HT-29 و Caco-2 با بیان بالا و پایین COX-2 به ترتیب به کار برده شد. هر دو دارو بر تقسیم سلولی تأثیر داشتند و تولید و فعالیت MMP-2 و MMP-9 در سلول های مذکور را به طور جزیی کاهش دادند. پروستاگلاندین های حاصل از COX-2، در متاستاز و تهاجم تومور و افزایش متالوپروتئازها در محیط تومور نقش دارند و اثر این داروها وابسته به زمان و غلظت می‌باشد (۲۲). مطالعات نشان می‌دهد که استفاده ی منظم از ایندومتاسین، باعث کاهش ۶۸-۶۱ درصدی سرطان ریه می‌شود. تیمار سلول‌های A549 با ۳۰۰ میکرومولار ایندومتاسین برای ۱۶ ساعت باعث کاهش رشد سلولی و تغییرات مورفولوژیک می‌گردد و القای این تغییرات قابل برگشت می‌باشد. همچنین، میزان تولید پروستاگلاندین ها را ۷۰-۳۰ درصد کاهش می‌دهد و اثر آن وابسته به زمان و غلظت است (۹).

در تحقیق حاضر تأثیر داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی ایبوپروفن و ایندومتاسین بر رشد رده‌ی سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بررسی شد. هر دو دارو توانستند رشد سلول‌های سرطانی را به طور معنی داری مهار سازند ($P < ۰/۰۵$)؛ به طوری که با افزایش غلظت، قدرت سلول کشی آن ها افزایش یافت و بیشترین اثر پس از ۷۲ ساعت مشاهده گردید. بر اساس نتایج بررسی‌های مختلف، هدف عملکردی این داروها می تواند آنزیم سیکلواکسیژناز باشد؛ چرا که COX-2 در بیشتر سرطان‌ها افزایش پیدا می‌کند و پروستاگلاندین‌های حاصل از COX-2 در سرطان‌زایی نقش مهمی دارد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات دیگر مشابه است.

مطالعه‌ای نشان داد که سلکوکسیب در غلظت ۱۰۰ میکرومولار به طور قابل توجهی تقسیم سلول های لنفوما را مهار می کند. علت تومورزایی با افزایش بیان COX-2 مرتبط با مقاومت به آپوپتوز می باشد. رده‌ی سلولی لنفوما به مدت ۴۸ ساعت با ۵۰ میکرومولار سلکوکسیب تیمار گردید. بیشتر از ۸۵ درصد آپوپتوز سلولی هم با رنگ‌آمیزی PI و هم توسط آنکسین V در سلول های لنفوما مشاهده شد.در نهایت این‌که اثر پیش‌آپوپتیک سلکوکسیب وابسته به غلظت می‌باشد (۲۳).

Nakamura و همکاران در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که داروی ضد التهابی غیر استروئیدی Etodolac، تقسیم سلولی را مهار و فرایند آپوپتوز را

در سلول‌های لوسمی HL60، U937، NB4، K562 و CEM القا می‌کند. داروی Etodolac، فرایند آپوپتوز سلولی را که با کاهش Bcl-2، فعالسازی کاسپاز ۳، ۹ و ۷ و کاهش مهارگرهای کاسپاز و Surviving مرتبط می‌باشد، در یک روش وابسته به غلظت القا می‌کند. همچنین، این دارو رشد سلول‌های K562 را در بدن موجود زنده کاهش می‌دهد (۱۳). در بررسی Park و همکاران این نتیجه به دست آمد که آسپرین از طریق فعالسازی کاسپازها و تنظیم ژن‌های درگیر در آپوپتوز، موجب القای آپوپتوز در سلول سرطانی YD-8 می‌گردد (۶).

نتایج حاصل از ژل الکتروفورز نیز نشان داد که ایبوپروفن و ایندومتاسین موجب القای آپوپتوز و قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های K562 می‌شوند. چنانکه داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی می‌توانند رشد نئوبلاستیک را توسط القای آپوپتوز در سلول سرطانی مهار کنند، مسیرهای درگیر در ایجاد فرایند آپوپتوز نیز توسط ایبوپروفن و ایندومتاسین می‌توانند باعث تغییر ژن‌های درگیر شوند که نیازمند بررسی‌های بیشتری است. همچنین، تغییرات مورفولوژیک سلول‌های K562 توسط رنگ‌آمیزی DAPI نشان دهنده‌ی آپوپتوز می‌باشد. از آن‌جایی که القای آپوپتوز روش مناسبی برای حذف سلول‌های سرطانی است و اغلب سلول‌های سرطانی دارای نقص در مکانیسم‌های آپوپتوزی خود می‌باشند، بنابراین یافتن ترکیباتی که بتواند باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود، یکی از اولویت‌های تحقیقاتی محسوب می‌گردد (۲۴). اهمیت این مطالعه در بررسی اثرات مهار رشدی و توان القای آپوپتوز در سلول‌های K562 لوسمی میلوئیدی مزمن انسان بود.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی ایبوپروفن و ایندومتاسین موجب مهار رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شوند، اما لازم است در مطالعات آینده، ژن‌ها و مسیرهای مولکولی درگیر در این اثر شناسایی گردد و با بررسی‌های بیشتر در زمینه‌ی بنیادی و بالینی، داروهای ضد التهابی در کنار سایر داروهای شیمی‌درمانی برای درمان لوسمی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از گروه زیست شناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه ارومیه به جهت همکاری و حمایت‌هایشان ابراز می‌دارند.

References

1. Mahmoudabadi A. Leukemia (blood cancer). Tehran, Iran: Kerdegari Publication; 2007. p. 11-55. [In Persian].
2. Hejazi S, Gholami A, Salarilak S, Khalkhali HR, Moosavi Jahromi L. Incidence rate of acute leukemia in west Azarbaijan during 2003-2008. Urmia Med J 2010; 21(2): 243-8. [In Persian].
3. O'Dwyer M. Multifaceted approach to the treatment of bcr-abl-positive leukemias. Oncologist 2002; 7(Suppl 1): 30-8.
4. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96(10): 3343-56.
5. Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. Blood 1996;

88(9): 3522-7.
6. Park IS, Jo JR, Hong H, Nam KY, Kim JB, Hwang SH, et al. Aspirin induces apoptosis in YD-8 human oral squamous carcinoma cells through activation of caspases, down-regulation of Mcl-1, and inactivation of ERK-1/2 and AKT. Toxicol In Vitro 2010; 24(3): 713-20.
7. Palayoor ST, Bump EA, Calderwood SK, Bartol S, Coleman CN. Combined antitumor effect of radiation and ibuprofen in human prostate carcinoma cells. Clin Cancer Res 1998; 4(3): 763-71.
8. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2011; 96(1-4): 27-36.
9. Kato T, Fujino H, Oyama S, Kawashima T, Murayama T. Indomethacin induces cellular morphological change and migration via epithelial-mesenchymal transition in A549 human lung cancer cells: a novel cyclooxygenase-inhibition-independent effect. Biochem Pharmacol 2011; 82(11): 1781-91.
10. Frenkian M, Pidoux E, Baudoin C, Segond N, Jullienne A. Indomethacin increases 15-PGDH mRNA expression in HL60 cells differentiated by PMA. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2001; 64(2): 87-93.
11. Robertson FM, Parrett ML, Joarder FS, Ross M, Abou-Issa HM, Alshafie G, et al. Ibuprofen-induced inhibition of cyclooxygenase isoform gene expression and regression of rat mammary carcinomas. Cancer Lett 1998; 122(1-2): 165-75.
12. Xu MH, Zhang GY. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. World J Gastroenterol 2005; 11(11): 1693-6.
13. Nakamura S, Kobayashi M, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, et al. COX-2 independent induction of apoptosis byetodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo. Cancer Therapy 2004; 2: 153-66.
14. Bellosillo B, Pique M, Barragan M, Castano E, Villamor N, Colomer D, et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 1998; 92(4): 1406-14.
15. Vondracek J, Stika J, Soucek K, Minksova K, Blaha L, Hofmanova J, et al. Inhibitors of arachidonic acid metabolism potentiate tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis in HL-60 cells. Eur J Pharmacol 2001; 424(1): 1-11.
16. Hojka-Osinska A, Ziolo E, Rapak A. Combined treatment with fenretinide and indomethacin induces AIF-mediated, non-classical cell death in human acute T-cell leukemia Jurkat cells. Biochem Biophys Res Commun 2012; 419(3): 590-5.
17. Khwaja F, Allen J, Lynch J, Andrews P, Djakiew D. Ibuprofen inhibits survival of bladder cancer cells by induced expression of the p75NTR tumor suppressor protein. Cancer Res 2004; 64(17): 6207-13.
18. Kim MH, Chung J. Synergistic cell death by EGCG and ibuprofen in DU-145 prostate cancer cell line. Anticancer Res 2007; 27(6B): 3947-56.
19. Janssen A, Maier TJ, Schiffmann S, Coste O, Seegel M, Geisslinger G, et al. Evidence of COX-2 independent induction of apoptosis and cell cycle block in human colon carcinoma cells after S- or R-ibuprofen treatment. Eur J Pharmacol 2006; 540(1-3): 24-33.
20. Lim WY, Chuah KL, Eng P, Leong SS, Lim E, Lim TK, et al. Aspirin and non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drug use and risk of lung cancer. Lung Cancer 2012; 77(2): 246-51.
21. Nakanishi Y, Kamijo R, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M. Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines. Eur J Cancer 2001; 37(12): 1570-8.
22. Santos RLS, Bergamo A, Sava G, de Oliveira Silva D. Synthesis and characterization of a diruthenium (II, III)–ketoprofen compound and study of the in vitro effects on CRC cells in comparison to the naproxen and ibuprofen derivatives. Polyhedron 2012; 42(1): 175-81.
23. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. Leuk Res 2004; 28(2): 179-90.
24. Jeong SY, Han MH, Jin CY, Kim GY, Choi BT, Nam TJ, et al. Apoptosis induction of human leukemia cells by Streptomyces sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. Int J Mol Med 2010; 25(1): 31-40.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.12.2014
Vol. 33, No. 328, 4th Week, May 2015
Accepted: 09.04.2015

The Effects of Ibuprofen and Indomethacin on Human Chronic Myelocytic Leukemia K562 Cell Line: An In-Vitro Study

Afsaneh Bapiri MSc[1], Mehdi Mohammadzadeh PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: The amount of COX-2 increases in most cancers due to synthesis of prostaglandins. Therefore, COX-2 inhibitors may play an effective role in cancer therapy. The goal of this study was to investigate the effect of ibuprofen and indomethacin, as anti-inflammatory drugs, on the K562 cell growth and proliferation.

Methods: The K562 cells were cultured and treated with different concentrations of indomethacin and ibuprofen. Then, their antitumor effects on K562 cells was assessed via MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] after 72 hours. DAPI staining (4',6-diamidino-2-phenylindole) and DNA electrophoresis were used for study of apoptosis.

Findings: Ibuprofen and indomethacin had antitumor effect on K562 and this effect increased by raise of time and concentration; so, the maximum of inhibitory effect was observed in higher concentration and 72 hours after the treatment. Statistical analysis indicated that both drugs inhibited the growth of K562 cells ($P < 0.05$).

Conclusion: Based on the results, ibuprofen and indomethacin are effective agents for chronic myeloid leukemia therapy and prevention; but these antitumor properties would warrant further studies on the clinical application.

Keywords: Nonsteroidal anti-inflammatory drug, Indomethacin, Ibuprofen, K562 cell line, Anti-cancer properties

Citation: Bapiri A, Mohammadzadeh M. **The Effects of Ibuprofen and Indomethacin on Human Chronic Myelocytic Leukemia K562 Cell Line: An In-Vitro Study.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(328): 389-99

1- Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding Author: Afsaneh Bapiri MSc, Email: afsanehbapir@yahoo.com