مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ۱٤۷-۱۳۹

القا تمایز و مرگ سلولی مشتقی از خانواده ی ۴-آریل- ۴-H کرومن ها بر روی NB4، لوسمی پرومیلوسیت حاد انسان

محمد حسن ناصری .MD[۱]، سعید حسامی تکلو .Ph.D[۲]، مجید مهدوی .Ph.D[۳*]، سید محمد امین موسوی .Ph.D[۳]، سوده اباصلتی .M.Sc[۳]، علیرضا فرومدی .Ph.D[۴]

۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی البرز و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه الله تهران
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار
۳- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
۴- گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

چکیده

هدف: در این مطالعه تاثیر یکی از مشتقات خانواده کرومن‌ها (3-BMPC) در القا تمایز و آپوپتوزیس در سلول‌های لوسمی NB4 به عنوان مدل لوسمی پرومیلوسیتی حاد (Acute promyelocytic leukemia: APL) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: اثر سمی (cytotoxic) 3-BMPC بر روی سلول‌های لوسمیک NB4 از طریق شمارش سلولی به‌وسیله هموسایتومتر بررسی شد و زنده بودن سلول با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی تمایز از رنگ‌آمیزی رایت گیمسا و فعالیت فاگوسیتوز (بیگانه خواری) سلول‌های تمایز یافته و برای بررسی آپوپتوزیس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با هوخست ۳۳۲۵۸ و مشاهده با میکروسکوپ فلورسنس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید.

نتایج: رده سلولی لوسمی NB4 انسانی پس از کشت، تحت تاثیر دارو در غلظت‌های مشخص (۱تا ۱۲ نانومولار) و فاصله‌های زمانی مختلف (۲۴ تا ۷۲ ساعت) قرار گرفت. مطالعه حاضر نشان داد که این ترکیب سبب مهار رشد وابسته به زمان و غلظت می گردد. IC50 این ترکیب بعد از ۷۲ ساعت ۳ نانومولار محاسبه گردید. نتایج نشان داد که بعد از ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های پایین (۳ نانو مولار) از 3-BMPC، سلول‌های NB4 به سمت ماکروفاژ/ مونوسیت تمایز یافتند. نتایج حاصل از رنگ آمیزی سلول‌ها با هوخست ۳۳۲۵۸ نیز نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌ها با غلظت IC50 ترکیب، آپوپتوزیس در سلولها القا شد.

نتیجه گیری: با توجه به اثر این ترکیب در القای تمایز و آپوپتوزیس، این ترکیب می‌تواند در کنار سایر ترکیبات دارویی به عنوان کاندیدای مناسبی برای درمان سرطان خون معرفی شود.

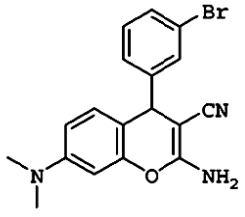
واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، ۴- آریل ۴- H کرومن، تمایز، لوسمی پرومیلوسیت حاد (APL)، سلول NB4

Archive of SID

www.SID.ir

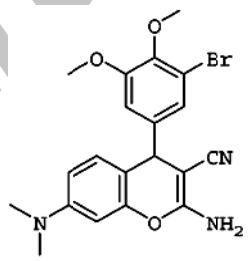
مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های محققین در شناسایی علل سرطان، هنوز درمان قطعی برای این نوع بیماران وجود ندارد. لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (Acute promyelocytic leukemia: APL) یکی از انواع سرطان خون با جابجایی کروموزومی۱۵ و ۱۷ [T(15, 17)] و تجمع پرومیلوسیت های نئوپلاستیک است که در تبدیل شدن به سلول‌های بالغ ناتوانند (۱). رده سلولی NB4 سلول‌های از خانواده لوسمی پرومیلوسیتیک (یا میلوئیدی) حاد است که به عنوان مدلی مناسب در تحقیقات بر روی لوسمی استفاده می‌شود (۲). روش‌های درمانی مختلفی تاکنون برای APL به کار برده شده است که از آن جمله می‌توان به شیمی درمانی، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد. اغلب داروهای شیمی درمانی با مهار تکثیر سلولی و پیش بردن سلول به سمت مرگ سلولی (آپوپتوزیس) فعالیت می‌کنند (۳ و ۴). مطالعات بر روی سلولهای NB4 نشان می‌دهد که این رده سلولی به‌وسیله تیمار با آل- ترانس رتینوئیک اسید (all-trans-retinoic acid :ATRA)، ۱۲- **o** تترادکانوئیل فوربول – ۱۳- استات (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate :TPA) و دی متیل سولفوکساید (dimethylsulfoxide :DMSO) می‌تواند به گرانولوسیت، مونوسیت/ماکروفاژ و نوتروفیل تمایز یابد (۵، ۶ و ۷). علاوه بر آن گزارش شده است که در بسیاری موارد، تمایز سلول‌های لوسمی با آپوپتوزیس همراه است (۸). آپوپتوزیس نوعی از مرگ سلولی سازمان یافته جهت حذف سلول‌های غیر نرمال است که سلول‌ها به اجسامی کوچک که توسط غشا محصور شده اند، تبدیل می‌گردد. جزئیات ریخت شناسی (مورفولوژی) این مرگ سلولی عبارتند از متراکم شدن هسته و سیتوپلاسم، چروکیده شدن سلول و سرانجام قطعه قطعه شدن DNA هسته ای درون اجسامی موسوم به اجسام آپوپتوزی (apoptotic bodies) (۹). تاکنون ترکیبات مختلفی برای القای تمایز و آپوپتوزیس جهت درمان لوسمی گزارش شده است. خانواده ۴-آریل- ۴-H کرومن ها (4-aryl-4-H chromenes) ترکیبات حلقوی هستند که فعالیت ضد سرطانی قوی داشته و با مهار تکثیر سلولی و برهم‌کنش با جایگاه کلشی سین در توبولین (β) باعث مهار پلیمریزاسیون توبولین‌ها شده که منجر به توقف (arrest) سیکل سلولی و آپوپتوزیس می‌گردند (۱۰ و ۱۱). فعالیت خانواده ۴-آریل- ۴-H کرومن ها با تغییر در بنیان R موجود در موقعیت ۴ بر اساس رابطه بین ساختار و فعالیت (SAR) با ثابت نگه داشتن گروه آمین در موقعیت ۲، گروه سیانید در موقعیت ۳ و گروه دی‌متیل‌آمین در موقعیت ۷ مورد بررسی قرار گرفته است. تاکنون ترکیبات متعددی از این ترکیبات سنتز شده که دارای فعالیت ضد سرطانی قوی می‌باشند. بنیان فنیل (Phenyl) در موقعیت ۴ فعالیت این ترکیبات را در حد نانومولار افزایش می‌دهد. به گروه فنیل می‌توان گروه‌های مختلفی اضافه نمود و فعالیت آپوپتوزی این ترکیبات را ارزیابی کرد. مطالعات نشان داده است که وجود گروه‌های کوچک، هیدروفوب و الکترون کشنده (electron-withdrawing) مثل گروه برم (Br) در موقعیت ۳ گروه فنیل (R) فعالیت این ترکیبات را افزایش می‌دهد (شمای۱ الف).



3-BC

الف



3-BMPC

ب

شمای ۱. الف) ۲-آمینو-۳- سیانو-۷- (دی متیل آمینو)-۴- (۳ بروموفنیل) ۴-H کرومن، ب) ۲-آمینو-۳- سیانو-۷- (دی متیل آمینو)-۴- (۳ بروموفنیل ۴ و ۵ دی متوکسی فنیل) ۴-H کرومن (3-BMPC).

وجود گروه های الکترون کشنده در موقعیت ۳ فعالیت را افزایش داده و وجود گروههای الکترون دهنده (electron- donating) مثل گروه OMe (O متوکسی) در موقعیت ۴ وقتی گروه الکترون کشنده در موقعیت ۳ وجود دارد، باعث افزایش فعالیت ترکیب می گردد (۱۰). بدین منظور مشتقی از این خانواده با نام *2-amino- 4-(3-bromo 4, 5 dimethoxy – phenyl) -3-cyano -7-(dimethylamino) -4H-chromene;* (3-BMPC) مورد بررسی قرار گرفت (شمای ۱ ب). هدف از مطالعه

Archive of SID
www.SID.ir

حاضر ساخت ترکیب 3-BMPC نبوده بلکه بررسی اثرات احتمالی مهار رشد، تمایز و مرگ سلولی (آپوپتوزیس) این ترکیب بر روی رده سلولی NB4 به‌عنوان مدلی برای APL است.

مواد و روش‌ها

مواد: در این مطالعه که به روش تجربی انجام گرفت محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت Biosera انگلستان تهیه شد. رنگ تریپان بلو (Trypan blue)، هوخست ۳۳۲۸۵ (Hoechst 33258) از شرکت Sigma و فلاسک های کشت سلول و ظروف ۹۶ و ۲۴ چاهکی از شرکت SPL life science کره جنوبی خریداری شد. اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylene diamine tetra acetic Acid (EDTA))، سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate (SDS))، تریس (Tris-HCl) از شرکت Merck آلمان خریداری شدند. آنتی‌بیوتیک های استرپتومایسین و پنی‌سیلین از شرکت سیناژن (تهران ـ ایران) خریداری شدند. برای کشت سلول، رده‌ی سلولی NB4 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و برای رشد آن از محیط کشت RPMI-1640 که غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پنی سیلین (۱۰۰U/mL) بود، استفاده گردید. محیط کشت سلول ها در محیط استریل و زیر هود مخصوص کشت سلول هر دو روز یکبار مورد تعویض قرار گرفت. سلول‌ها در مدت کشت سلولی در فلاسک‌های استریل و در انکوباتور مخصوص کشت سلولی با شرایط CO_2 ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت.

تهیه ۴-آریل ۴-H کرومن 3-BMPC ۱۰ میلی‌مولار پیپریدین (piperidine) به مخلوطی از ۳- دی متیل آمینو فنول (۵ میلی‌مولار)، ۳- نیتروفنیل بنزالدئید (۵ میلی‌مولار) و مالونیتریل (۵ میلی مولار) در اتانول (۲۰ میلی‌لیتر) اضافه شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۲ ساعت حرارت داده شد. بعد از سرد کردن ، مخلوط رسوبی شکل جامد فیلتر و با اتانول سرد شسته شد و از همان محلول کریستالیزه گردید. ترکیب 3-BMPC به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از چندین محلول با قطبیت‌های متفاوت خالص گردید. ساختار این ترکیب بوسیله IR، 1H NMR و اسپکترومتری جرمی (MS) در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تایید قرار گرفت (۱۰ و ۱۲).

بررسی مهار رشد و زنده بودن(Viability): برای این منظور ۵×۱۰^{۴} سلول NB4 را شمارش و در محیط کشت ۲۰۰ میکرولیتر در ظروف کشت ۹۶ تایی ریخته و بعد از ۲۴ ساعت، با غلظت‌های مختلف دارو (۱ تا ۱۲ نانومولار) برای زمان‌های متفاوت (۲۴ تا ۷۲ ساعت) تیمار شدند. در هر بازه‌ی زمانی تعداد سلول‌های هر چاهک با استفاده از لام هموسایتومتر و آزمون تریپان بلو مورد شمارش قرار گرفت.

مطالعه ریخت شناسی سلول های تمایز یافته: به‌منظور بررسی وقوع تمایز از میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی رایت و گیمسا (Wright giemsa) استفاده شد. این نوع رنگ‌آمیزی برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلول (هسته و سیتوپلاسم) که در معرض ترکیبات دارویی مختلفی قرارگرفته بکار برده شد (۱۳ و ۱۴).

آزمایش فاگوسیتوز ذرات لاتکس (Latex Particle): احتمال تمایز سلول‌ها به ماکروفاژ از طریق بررسی توانمندی آن‌ها در بلعیدن ذرات لاتکس پوشیده شده با پروتئین بررسی شد. در این خصوص، سوسپانسیونی از محلول لاتکس با PBS به نسبت ۱/۱۰ رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به سلول‌های کنترل و دارو دیده (۵۰ هزار سلول) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت با ۲۰ درصد PBS اضافه شد. مخلوط برای ۶۰ دقیقه در انکوباتور نگهداری شد. هر نمونه سلولی سپس ۳ مرتبه با PBS سرد شسته شده و مجددا در PBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. سلولهایی که حداقل ۱۰ ذره لاتکس را بلعیده باشند مثبت در نظر گرفته شدند (۱۳).

مطالعه ریخت شناسی سلول های آپوپتوزی: به منظور بررسی وقوع مرگ سلولی و تشخیص آنکه مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس می‌باشد، از میکروسکوپ فلورسنس و رنگ آمیزی هوخست ۳۳۲۸۵ استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول‌های طبیعی به صورت رنگ آبی یکنواخت دیده می‌شوند، در صورتی که هسته سلول‌های دستخوش آپوپتوزیس به واسطه متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته، به طور غیر منظم و به صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده است. برای تهیه این محلول، ۱ میلی‌گرم هوخست در ۱ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل گردید. بعد از رسوب و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات،

Archive of SID

www.SID.ir

۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۵×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر) با ۱ میکرولیتر از رنگ هوخست مخلوط و ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام میکروسکوپی قرار داده شد. بعد از تهیه‌ی اسمیر سلولی پوشانده شده بر روی لام با میکروسکوپ فلورسنس (Zeiss- آلمان) مشاهده گردید (۱۵).

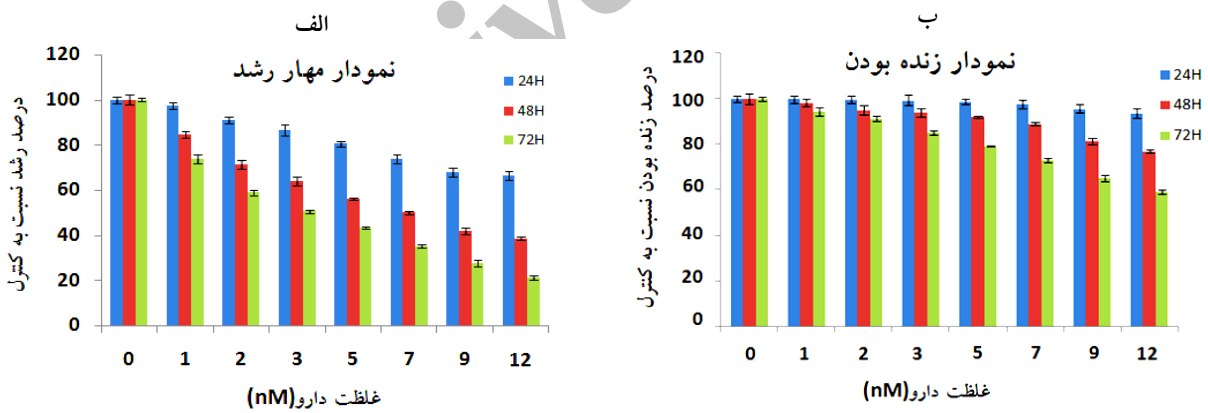
آزمون قطعه قطعه شدن DNA: با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA وقوع آپوپتوزیس مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا سلول های کنترل و تیمار شده با دارو تحت تاثیر بافر لیز کننده [SDS 0.1 EDTA 10 mM, W/V, Tris-HCl 10 mM, (pH 7.4)] قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ DNA با استفاده از ترکیب فنل ـ کلروفورم ـ ایزوآمیل الکل جداسازی شده با اتانول مطلق و۵ مولار NaCl به مدت یک شب رسوب داده شد. در نهایت رسوب DNA در بافر ۱۰mM (Tris – HCl, EDTA 10mM)TE حل شد و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۱۰ ولت بارگذاری (Load) شد (۱۶).

تجزیه و تحلیل داده ها: مقایسه‌ی میزان رشد و زنده بودن بین سلول‌های تحت تیمار با دارو و مقایسه‌ی آن با سلول های تیمار نشده صورت گرفت و از آزمون t-test برای یافتن اختلافات معنادار استفاده شد. در این آزمون داده هایی با $P<۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

مطالعه رشد و زنده بودن سلول‌های NB4 تیمار شده با 3-BMPC

در راستای تاثیر 3-BMPC بر روی سلول‌های NB4 (لوسمی پرومیلوسیتی) ابتدا محدوده IC50 تعیین شد. بدین منظور ابتدا ۵×۱۰^{۵} از سلول های NB4 شمارش و در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و با غلظت‌های مختلف ۱تا ۱۲ نانومولار تیمار گردید. در مرحله‌ی اول اثرات مهار رشدی که توسط دارو بر روی سلول‌ها القا شد با روش شمارش سلولی از طریق هموسایتومتر و رنگ آمیزی تریپان بلو مورد بررسی قرا گرفت. همانطور که در شکل ۱-الف مشاهده می گردد تیمار سلول‌ها با غلظت های متفاوت دارو در زمان های ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت باعث کاهش چشمگیر رشد سلولی گردید. مهار رشد سلولی سلول‌های NB4 تیمار شده با دارو به طور محسوس از غلظت ۳ نانومولار در زمان ۲۴ ساعت شروع و تا ۷۲ ساعت ادامه داشت (شکل ۱-الف و ب).



شکل ۱ : اثرات وابسته به غلظت و زمان دارو بر روی مهار رشد (الف) و زنده بودن (ب) سلول های NB4. سلول های NB4 در ظروف کشت ۹۶ خانه ای کشت شدند. سپس سلول های هر چاهک با غلظت های مختلف دارو در زمان های متفاوت تیمار گردید. مهار رشد و توانایی زنده ماندن سلول ها با کمک تست تریپان بلو بررسی شد. نتایج میانگین ۳ آزمایش مستقل می باشد، $p\leq۰/۰۵$

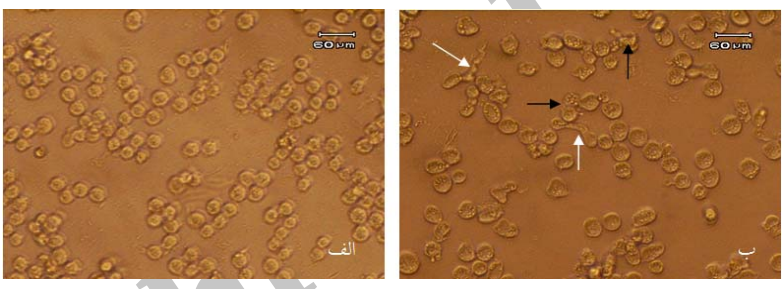
همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود اثرات مهار رشدی دارو بر روی سلول های NB4 به صورت وابسته به غلظت و زمان افزایش یافته به طوری که در غلظت ۳ و ۱۲ نانومولار (در ۷۲ ساعت) به ترتیب به ۱/۳±۵۰ و ۲/۲±۱۸ درصد نسبت به سلول‌های کنترل رسید. IC50 این دارو بعد از۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب۱۲، ۱/۱± ۷ و ۰/۶±۳ نانو مولار محاسبه گردید (شکل ۱-الف). داده های بدست آمده از آزمایش تریپان بلو (شکل ۱- ب) نشان داد که دارو علاوه بر مهار رشد سلولی، موجب القای مرگ سلولی آپوپتوزیس در بین سلول‌های تحت تیمار با دارو می‌گردد. همانطور که در شکل ۱- ب مشاهده می‌شود زنده بودن سلول های NB4 تحت اثر دارو در ۲۴ ساعت تغییر معناداری را نشان نمی‌دهد. این در حالی است که در ۴۸ و

www.SID.ir
Archive of SID

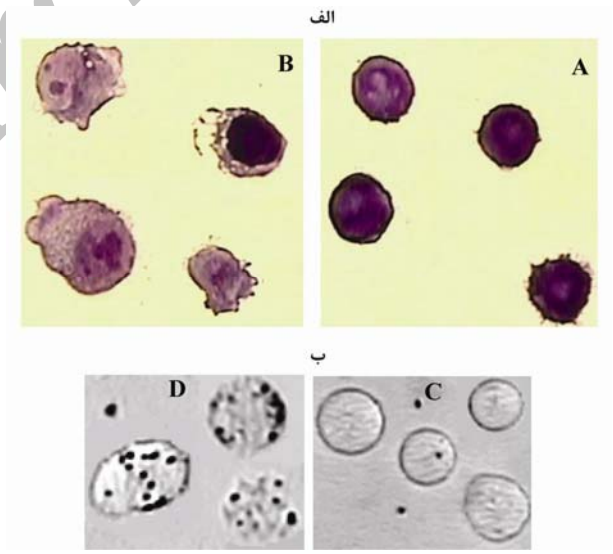
۷۲ ساعت (در غلظت های بالا) به صورت وابسته به غلظت کاهش چشم گیری مشاهده می‌شود. به طوری که بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار با ۹ نانومولار دارو، زنده بودن سلول‌های NB4 به ترتیب ۳/۵±۲۰ و ۲/۷±۳۲ درصد کاهش یافت.

بررسی القا تمایز سلول های NB4 تیمار شده با دارو

به منظور بررسی مهار رشد و القا تمایز، سلول های سرطانی NB4 در محیط کشت RPMI1640 کشت داده شدند. تعداد سلول‌های کنترل NB4 با گذشت زمان به طور فزاینده‌ای افزایش یافته در حالی‌که در سلول‌های تیمار شده در غلظت‌های بین ۱ تا ۱۲ نانومولار روند رشد سلولی کند شده و در نهایت موجب کاهش در تعداد سلول‌های تیمار شده با دارو نسبت به کنترل گردید (شکل ۱-الف). این نکته که دارو در زمان‌های کوتاه مانند ۲۴ ساعت بر روی کاهش تکثیر سلولی تاثیرگذار است می‌تواند نشان از تاثیر دارو بر روی چرخه سلولی باشد. اثرات دارو بر روی ریخت شناسی سلول های NB4 تیمار شده در غلظت‌های مختلف و در زمان ۷۲ ساعت با میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. تغییرات ریخت شناسی در سلول‌ها از ۱۲ ساعت به بعد پس از تیمار آن‌ها با ترکیب 3-BMPC شروع شد به طوری که ابتدا سلول‌ها شروع به چسبیدن به ظرف کشت نموده وتشکیل پاهای کاذب دادند. تشکیل پاهای کاذب در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد. تشکیل پاهای کاذب (پیکان‌های سفید) از ۲۴ ساعت شروع شده و تا ۷۲ ساعت ادامه یافت. در مقایسه با سلول‌های کنترل، در بیشتر از ۶۰ درصد سلول‌ها، نسبت سیتوپلاسم به هسته وسیعتر شد(شکل ۳-الف). این حالت نشان از تمایز سلول‌ها به سلول‌های مونوسیت/ ماکروفاژ می‌باشد. جهت تایید تمایز سلول‌های تیمارشده با دارو به سلولهای مونوسیت/ ماکروفاژ، آزمایش فاگوسیتوز ذرات لاتکس انجام شد. همانطور که در شکل ۳- ب دیده می شود سلول‌های تیمار شده با غلظت مشخص دارو (۳ نانومولار) قادر به فاگوسیتوز ذرات لاتکس بعد از ۷۲ ساعت می‌باشند.



شکل ۲: ریخت شناسی سلول‌های (NB4). الف: سلول‌های (NB4) در عدم حضور دارو، ب : سلول‌های NB4 تیمار شده با ترکیب 3-BMPC در غلظت IC50 و در زمان ۷۲ ساعت، پیکانهای سیاه سلول‌های آپوپتوزی و پیکان‌های سفید سلول‌های تمایز یافته را نشان می‌دهد.

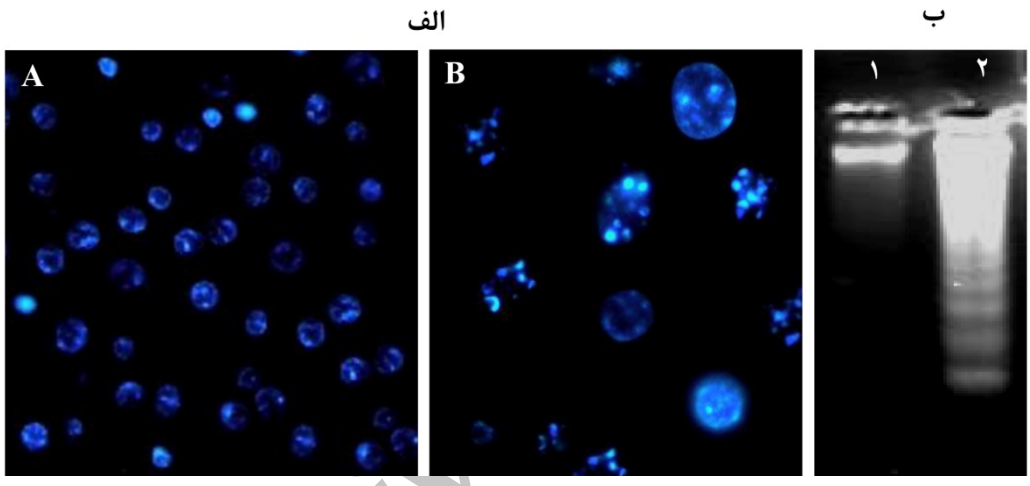


شکل ۳: الف) تغییرات ریخت‌شناسی حاصل از رنگ‌آمیزی رایت- گیمسای سلولهای NB4 تیمار شده با ۳ نانومولار از دارو بعد از ۴۸ ساعت. A) سلول‌های کنترل؛ B) سلول‌های دارو دیده. ب) فعالیت فاگوسیتوز (بیگانه خواری) در سلول‌های NB4 بعد از ۴۸ ساعت از تیمار با ۳ نانومولار از دارو. C) سلول‌های کنترل؛ D) سلول‌های در حضور دارو.

www.SID.ir

بررسی اثرات دارو بر القا آپوپتوز در سلول های NB4

مطالعات اثرات دارو بر روی سلول‌های NB4 با استفاده از رنگ تریپان بلو نشان دهنده‌ی آن است که دارو سبب مرگ سلولی می‌شود (شکل ۱-ب). برای مشخص شدن نوع مرگ سلولی و بررسی این موضوع که آیا دارو سبب القای مرگ از طریق آپوپتوزیس می‌شود یا خیر از میکروسکوپ فلورسنس و تست قطعه قطعه شدن DNA استفاده گردید. همان‌طور که در شکل ۴-الف مشاهده می‌شود مشخص شد که در میان سلول‌های تیمار شده با دارو (در غلظت IC50) پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌های با اجسام آپوپتوتیک که نشان دهنده مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس است دیده می شود. همچنین برای اثبات بیشتر موضوع از آزمون قطعه قطعه شدن DNA استفاده شد. براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۴-ب، DNA ی تیمار شده با دارو به صورت نردبانی (Ladder) بر روی ژل آگارز مشاهده می شود در حالی که این حالت در سلول های تیمار نشده مشاهده نمی گردد. بنابراین، این آزمون در کنار داده های به دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنس به طور کامل اثبات می‌کند که دارو از طریق آپوپتوزیس سبب القای مرگ در سلول های سرطانی NB4 شده است.



شکل ۴: الف) مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس در سلول های NB4 تیمار شده با ترکیب BMPC -3. A) سلول های NB4 در عدم حضور دارو. B) سلول های NB4 تیمار شده در غلظت IC50 بعد از ۷۲ ساعت. ب) DNA ژنومی سلول‌های کنترل و تیمار شده با غلظت ۷ نانومولار دارو به مدت ۷۲ ساعت استخراج شد و به کمک الکتروفورز میزان قطعه قطعه شدن DNA به عنوان شاخصی برای آپوپتوزیس بررسی شد. چاهک ۱: کنترل و چاهک ۲: سلول‌های تیمار شد.

پایه‌ای برای طراحی منطقی تر داروهای ضد سرطان بوده است (۱۷). با توجه به فاکتور مقاومت دارویی در رده‌های سرطانی سلول‌های خونی تلاش های گسترده‌ای در جهت یافتن ترکیبات موثرتر که پتانسیل بیشتری برای سیتوتوکسیتی داشته باشد و قادر به غلبه بر مقاومت دارویی باشد، جریان دارد (۱۰). بسیاری از ترکیبات ضد سرطانی با ایجاد توقف در چرخه سلولی در S/G1 یا G2/M باعث القا مرگ سلول آپوپتوزیس می‌شوند. نقاط کنترل چرخه سلولی یکی از رفتارهایی است که سلول برای تعمیر DNA خود اتخاذ می کنند و مرگ سلولی باعث حذف سلول‌هایی که دچار صدمات جبران ناپذیری شده‌اند، می‌گردد. بر اساس مطالعاتی که انجام شده کرومن‌ها باعث توقف چرخه سلولی در فاز G2/M می شوند. تجمع در فاز G2/M عمدتا بر اثر عوامل تخریبی DNA مانند تشعشعات γ ترکیبات پایدار

بحث

لوسمی میلوئیدی حاد یک اختلال نئوپلاستیک در سلول‌های خونساز می‌باشد که در نتیجه‌ی اختلالات کروموزومی و جهش در سلول‌های پیش ساز خونی ایجاد می‌شود. به‌همین دلیل، توانایی سلول‌ها برای پاسخ به پیام‌هایی که تمایز و بلوغ را تحریک می‌کنند، از بین می رود. یکی از انواع لوسمی ها، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL) است که در تبدیل شدن به سلول‌های بالغ ناتوانند (۱). شیمی درمانی بیماری‌های سرطانی در سال‌های اخیر با اهمیت فزاینده‌ای همراه بوده است (۱۷). تاکنون پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در بسیاری از جنبه‌های تحقیقاتی به چشم می‌خورد به‌طوری که افزایش دانش ما در مورد دانش بیولوژی تومور، مکانیسم عمل داروهای آنتی نئوپلاستیک را برای ما روشن‌تر کرده است. این موضوع همچنین

www.SID.ir
Archive

رشد تا ۷۸ درصد در سلول‌های NB4 گردید. لازم به ذکر است که 3-BMPC در زمان‌های کوتاه سبب مهار تکثیر سلولی سیتواستاتیک (Cytostatic) و در زمان‌های طولانی‌تر مانند ۴۸ و۷۲ ساعت باعث القا مرگ سلولی سیتوتوکسیک (Cytotoxic) می‌شود (شکل ۱- الف و ب). سلول NB4 به عنوان مدلی برای لوسمی پرومیلوپلاستی محسوب می‌شود به‌طوری‌که غلظت و زمان بهینه‌ی 3-BMPC، ۳ نانومولار بعد از ۷۲ ساعت از تیمار می‌باشد. نتایج بدست آمده از بررسی ریخت شناسی سلول‌های NB4 تیمار شده با دارو نشان از تمایز سلول‌ها به سلول‌های مونوسیت/ ماکروفاژ می‌باشد (شکل ۳-الف و ۳-ب). تحقیقات قبلی اثرات مشتقات مختلفی از کرومن‌ها بر روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف را نشان می‌دهد اما تنها به وقوع آپوپتوزیس و اثرات مهار رشد این ترکیبات اشاره شده است (۱۶ و ۲۲). در این تحقیق علاوه بر اثرات سیتوتوکسیک این ترکیب (3-BMPC)، القا تمایز در رده سلولی خونی NB4 نیز بررسی شد. لذا این ترکیب می‌تواند علاوه بر جنبه درمانی از دیدگاه زیست شناسی به عنوان مدلی برای بررسی این نوع تمایز (مونوسیت/ماکروفاژ) استفاده شود. داده‌های به‌دست آمده از میکروسکوپ فلوروسنس و آزمون قطعه قطعه شدن DNA نیز نشان داد که دارو سبب القا آپوپتوزیس در سلول‌های NB4 می شود. (شکل ۴-الف و ۴-ب). به‌طور کلی آپوپتوزیس بر اساس محرک یا القا کننده‌ی آن از مسیرهای مختلفی به وقوع می‌پیوندد. امروزه دو مسیر اصلی القا آپوپتوزیس شناسایی شده است. مسیرخارج سلولی و مسیر داخل سلولی که هر دو مسیر از طریق فعال شدن کاسپاز ها منجر به مرگ سلولی آپوپتوزیس می‌شوند. از آنجایی که اختلال در فرایند آپوپتوزیس یکی از نقص‌های رایج در سلول‌های سرطانی می‌باشد. القا آپوپتوزیس می‌تواند به‌عنوان یکی از استراتژی‌های مورد توجه در درمان سرطان به شمار آید. با توجه به این موضوع اثر آپوپتوزی این دارو بر سلول‌های NB4 حائز اهمیت است. مطالعات مختلفی که اثرات کرومن‌ها را بر روی سلول‌های مختلف سرطانی بررسی نموده‌اند انجام شده است، از جمله اثر این ترکیب روی سلول‌های Jurkat و HL60 نیز گزارش شده است که همگی این مطالعات به خاصیت آپوپتوزی و ضد سرطانی آن اشاره داشته‌اند (۱۰). از نقطه نظر مکانیسمی و با توجه به اطلاعات موجود یکی از شناخته شده‌ترین بر هم‌کنش 3-BMPC با میکروتوبول، بر هم کنش آن از طریق اتصال به توبولین (β) در محل اتصال کلشی سین یا در نزدیکی آن است. به نظر می رسد القا آپوپتوزیس از طریق مهار کردن کننده‌ای میکروتوبول و مهارکننده‌ی توپوایزومرازها می‌باشد (۱۸).

در سال‌های اخیر تحقیقات قابل توجهی در مورد اثر عوامل تمایز دهنده و کشنده سلول (آپوپتوتیک) در درمان لوسمی میلوئیدی و به‌خصوص لوسمی پرومیلوسیتی انجام شده است. یکی از این داروها، آل ترانس رتینوئیک اسید (ATRA) است که مورد استفاده قرار می گیرد (۱۹). از دیگر داروهای تجویز شده برای بیماران لوسمی پرومیلوسیتیک، تری اکسید آرسنیک (arsenic-oxide -3) است که در ۸۵ درصد بیماران APL مفید بوده است. امروزه به‌دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی، مقاومت‌های دارویی و از طرفی شناخت پروتئین‌های ادغامی و پیدا کردن نقاط اثری برای القا تمایز و آپوپتوزیس انتخابی ساخت و طراحی ترکیباتی که بتواند با اثرات جانبی کمتر تاثیرات داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایز دهنده را افزایش بدهد، مورد توجه قرار گرفته است (۲۰ و ۲۱).

در این مطالعه اثرات ضد سرطانی مشتقی از این ترکیبات (کرومن ها) و خواص سیتوتوکسیک آن بر روی سلول NB4 به‌عنوان مدلی برای لوسمی پرومیلوسیتی بررسی شد. رشد وتوسعه تومورمعمولا درنتیجه عدم وقوع مرگ طبیعی و تنظیم شده سلولی (آپوپتوزیس) در هر یک ازبافت‌های بدن می‌باشد و یا ممکن است به علت تکثیر نامنظم سلول‌ها صورت گیرد و از طرفی مشخص شده است که بعضی ازعوامل سیتوتوکسیک قادر به القا آپوپتوزیس در سلول‌های توموری می‌باشند. مکانیسم اثر این ترکیبات سیتوتوکسیک، برروی سلول متفاوت است. این تحقیق اثرات سیتوتوکسیک و القا آپوپتوزیس مشتقاتی از ترکیبات کرومن را مورد بررسی قرار داد. طبق مطالعات انجام یافته مشتقات دیگر این ترکیبات ازطریق تداخل در تشکیل توبولین و یا ممانعت در پلیمرازسیون توبولین باعث القا آپوپتوزیس درسلول‌های توموری می‌گردد. این ترکیبات از طریق مهار پلیمریزاسیون توبولین ها باعث مهار تشکیل دوک میتوزی و در نهایت منجر به توقف سیکل سلولی (arrest) می‌شوند (۱۰ و ۱۱). توقف چرخه سلولی موجب تولید سیگنال آپوپتوزیس و مرگ سلولی از طریق کاسپازها می شود. 3-BPMC که یکی از مشتقات خانواده کرومن‌ها است که بر روی حلقه‌ی فنیلی خود دارای اتم Br می‌باشد. اتم Br سبب تقویت و افزایش فعالیت بیولوژیک این ترکیب می گردد (۶). در این مطالعه مشخص شد که این ترکیب به صورت وابسته به غلظت و زمان، سبب مهار

Archive of SID

www.SID.ir

عمل‌کرد میکروتوبول‌ها از طریق تنظیم ژن‌های تنظیم کننده‌ی آپوپتوزیس مانند p53، Bcl-2 و Bcl-x می‌باشد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که این ترکیبات باعث فسفوریلاسیون Bcl-2 شده و این فسفوریلاسیون باعث آغاز فعالیت کاسپاز ها می گردد (۲۳ و ۲۴).

نتیجه‌گیری

در خاتمه داده های حاصل از این مطالعه نشان داد که 3-BMPC، به‌عنوان یکی از ترکیبات خانواده کرومن ها به دلیل دارا بودن خاصیت آپوپتوزی و القاء مهار رشد از اهمیت ویژه ای برخوردار است. این ترکیب بر روی رده سلولی NB4 به‌عنوان مدلی برای APL (لوسمی پرومیلوسیتی حاد) اثرات آپوپتوزی شدیدی از خود نشان داد به طوری که بعد از زمان ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌ها با ۱۲ نانومولار از دارو، رشد سلول‌ها مهار و مرگ سلولی آپوپتوزیس القا شد. به‌طور کلی با توجه به رفتار موثر این ترکیب در القا تمایز و آپوپتوزیس به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای مطالعات فارماکولوژیک آینده جهت درمان سرطان خون باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی البرز جهت تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند. همچنین از دانشگاه تبریز، دانشگاه تهران و دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام بسیاری ازمراحل آزمون‌ها، نهایت سپاسگزاری را داریم.

منابع

1. Yi Wang Zh , Chen Zh, Hu J, Shen Zhi-Xiang, et al. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. Pharmacol.Ther 1997; 76: 141-9.

2. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978; 75(5): 2458-2462.

3. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, et al.Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. Leukemia.2003; 17(7): 1211-1162.

4. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment.N Engl J Med. 2003; 349(15): 1451.

5. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, et al. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. Leuk Res. 1999; 23(3): 263-269.

6. Koeffler HP, Bar-Eli M, Territo MC. Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation. Cancer Res. 1981; 41: 919-926.

7. Koeffler HP. Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. Blood. 1983; 62(4): 709–721.

8. Martin SJ, Bradley JG, Cotter TG. HL-60 cells induced to differentiate toward neutrophils subsequently die via apoptosis. Clin. Exp. Immunol. 1990; 79(3): 448-453.

9. Kerr JF, Winterford CM and Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994; 73: 2013- 2026.

10. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 1. Structure-activity relationships of the 4-aryl group. J Med Chem. 2004; 47(25): 6299-310.

11. Kemnitzer W, Jiang S, Wang Y, et al. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay. Part 5: Modifications of the 2-and 3-positions . Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008; 18: 603–607.

12. Foroumadi A, Dehghan G, Samzadeh-Kermani A., Arabsorkhi F., Sorkhi M., Shafiee A, et al. Synthesis and antioxidant activity of some 2-amino-4-aryl-3-cyano-7-(dimethylamino)-4H-chromenes. Asian Journal of Chemistry. 2007; 19(2): 1391-96.

13. Yazdanparast R, Mahdavi M, Moosavi MA. Induction of differentiation and apoptosis in three human leukemia cell lines by a new compound from Dendrostellera lessertii. Acta Biochim Biophys Sin. 2006; 38(7): 477-83.

14. Yazdanparast R, Moosavi MA, Mahdavi M, Lotfi A. Guanosine 5'-triphosphate induces differentiation-dependent apoptosis in human leukemia U937 and KG1 cells. Acta Pharmacol Sin. 2006; 27(9): 1175-84.

15. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. Annu Rev Med. 1997; 48: 353 –74.

16. Mahdavi M, Davoodi J, Zali MR, Foroumadi A. Concomitant activation of caspase-9 and down-regulation of IAP proteins as a mechanism of apoptotic death in HepG2, T47D and HCT-116 cells upon exposure to a derivative from 4-aryl-4H-chromenes family. Biomed Pharmacother. 2011; 65(3): 175-82.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, et al. Mitochondrial gateways to cancer. Molecular Aspects of Medicine. 2010; 31: 1–20.

18. Lu MC, Yang SH, Hwang SL, et al. Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. Life Sciences. 2006; 78(20): 2378 – 2383.

19. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, et al. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. Leuk Res. 1999 ; 23(3): 263-9.

20. Mahdavi M, Yazdanparast R. Gnidilatimonoein from Daphne mucronata induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. Arch Pharm Res. 2007; 30(2): 177-81.

21. Yazdanparast R, Moosavi MA, Mahdavi M, Sanati MH. 3-Hydrogenkwadaphnin from Dendrostellera lessertii induces differentiation and apoptosis in HL-60 cells. Planta Med. 2005; 71(12): 1112-7.

22. Aryapour H, Mahdavi M, Mohebbi SR, Zali MR, et al. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of the Derivatives from 4-aryl-4H-chromene Family on Human Leukemia K562 Cells. Arch Pharm Res. 2012; 35(9): 1573-82.

23. Fan W. Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. Biochem Pharmacol. 1999; 57: 1215–21.

24. Kasibhatla S, Gourdeau H, Meerovitch K, et al. Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. Mol Cancer Ther. 2004; 3(11).

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Summer 2013; 4(2): 139-147

Induction of Differentiation and Cell Death of the Derivative of 4-aryl-4H-Chromenes Family on NB4 Human Promyelocytic Leukemia Cell Line

Naseri MH. MD.[1], Hesami tackallou S. Ph.D.[2], Mahdavi M. Ph.D.[3*], Moosavi MA. Ph.D.[3], Abasalti S. M.Sc.[3], Foroumadi A. Ph.D.[4]

1. Alborz University of Medical Sciences, Tehran, Iran & Baghiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Garmsar Islamic Azad University, Garmsar, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
4. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Email corresponding author: majid.mahdavi@tabrizu.ac.ir
Received: 30 Sep. 2012 Accepted: 1 Jan. 2013

Abstract

Aim: Chromene derivatives are able to growth inhibition and induce apoptosis in different cell types. In this study, we reported a derivative of 4-aryl-4H-chromenes with differentiation and apoptotic activity against NB4, Acute Promyelocytic Leukemia (APL) cell.

Matherial and Methods: The cells were seeded in 24-well plates at 1×10^5 cells/well and treated with 1−12 nM of the 2-amino- *4-(3-bromo 4, 5 dimethoxy – phenyl) -3- cyano -7-(dimethylamino) -4H-chromene* (3-BMPC). This compound inhibited growth and viability of the cells in dose- and time-dependent manner. 3-BMPC was found to be highly active growth inhibitor with IC50 of 3 nM (72 h) as determined by trypan blue exclusion test. Wright-Giemsa staining and latex particle phagocytosis assay were used to study differentiated cells. Apoptosis was also detected by fluorescent microscope and DNA fragmentation assay.

Results: Results indicated that at low concentrations (3 nM) and after 48 h of treatment, NB4 cells were differentiated to monocyte/macrophage lineage. Results of Hoechst 33258 staining also revealed that the compound induced apoptosis at respective IC50 value after 72 h of treatment.

Conclusion: Regarding these results, this compound can be proposed as effective agents for more investigation in leukemia treatment.

Keywords: Acute Promyelocytic Leukemia, Apoptosis, 4-aryl-4H-chromenes, Differentiation, NB4 cell

Archive of SID

www.SID.ir