Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:36 IRST on Tuesday December 27th 2016

BRIEF REPORT

Inhibitory Effect of Ibuprofen on Angiogenesis in Gastric Cancer Stem Cells

Fatemeh Mahmoodi[1],
Hassan Akrami[2]

[1] MSc in Cell and Molecular Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received September 14, 2015 ; Accepted July 18, 2016)

Abstract

Background and purpose: Angiogenesis provides proper nutrition and helps to the development and spread of cancer cells. Cancer stem cells are a rare population of tumor cells responsible for initiation, spreading and growth of cancer. Angiogenesis occurs more in cancer stem cells compared with other cancer cells. Ibuprofen, as a member of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) group is used for prevention and treatment of certain cancers. In the present study, we investigated the effect of ibuprofen on angiogenesis in gastric cancer stem cells.

Materials and methods: Gastric cancer stem cells of MKN45 cell line was isolated by spheroid colony formation technique. Gastric cancer stem cells were treated with various concentrations of ibuprofen. The angiogenic properties in gastric cancer stem cells treated with ibuprofen was compared with control cells using two-dimensional angiogenesis.

Results: Angiogenesis reduced in the cancer stem cells treated with ibuprofen compared with the control cancer stem cells.

Conclusion: Ibuprofen decreased angiogenesis in gastric cancer stem cells.

Keywords: ibuprofen, angiogenesis, gastric cancer stem cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(143): 224-229 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:36 IRST on Tuesday December 27th 2016

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۳ آذر سال ۱۳۹۵ (۲۲۹-۲۲۴)

مطالعه اثر مهاری ایبوپروفن بر رگ زایی در سلول های بنیادی سرطان معده

فاطمه محمودی[۱]
حسن اکرمی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: رگ‌زایی از طریق مهیا کردن مواد غذای به رشد و گسترش سرطان کمک می‌کند. در هر بافت سرطانی، جمعیت نادر و متمایز از سلول‌ها به نام سلول‌های بنیادی سرطانی وجود دارند که مسئول شروع، گسترش، متاستاز و تهاجم در سرطان‌ها شناخته شده‌اند. رگ زایی در سلول‌های بنیادی سرطانی نسبت به سایر سلول‌های توموری بیش‌تر رخ می‌دهد. ایبوپروفن به عنوان عضوی از خانواده داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی برای پیشگیری و درمان سرطان‌های خاصی استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر تاثیر داروی ایبوپروفن بر توانایی رگ‌زایی سلول‌های بنیادی سرطان معده بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی انجام شده ابتدا سلول‌های بنیادی سرطانی از رده سلولی سرطان معده MKN45 با استفاده از تکنیک تشکیل اجسام کروی (spheroid colony formation) جداسازی شد و سپس با غلظت‌های مختلفی از داروی ایبوپروفن تیمار شدند. نهایتاً اثر این دارو بر توانایی رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی سرطانی تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل با استفاده از مدل تشکیل لوله بررسی شد.

یافته‌ها: رگ‌زایی در سلول‌های بنیادی سرطانی تیمار شده با ایبوپروفن در مقایسه با سلول‌های بنیادی سرطانی کنترل کاهش پیدا کرد.

استنتاج: ایبوپروفن رگ‌زایی را در سلول‌های بنیادی سرطان معده کاهش می‌دهد.

واژه های کلیدی: ایبوپروفن، رگ زایی، سلول های بنیادی سرطان معده

مقدمه

آنژیوژنز یا رگ زایی به جوانه‌زدن انشعاب‌های مویرگی از رگ‌های خونی از پیش موجود اشاره دارد. تعادل بین فاکتورهای تحریک‌کننده و مهارکننده‌ی رگ‌زایی، کنترل‌کننده‌ی رگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیک می‌باشد(۱). مشاهداتی در مورد اثرات ضد سرطانی داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی non-steroidal anti-inflammatory drugs گزارش شده است. مطالعات انجام شده گویای این مطلب است که داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی در مهار رگ‌زایی نیز نقش دارند(۴-۲). یکی از شایع‌ترین سرطان‌های انسانی و دومین سرطان کشنده در جهان، سرطان معده است(۵). در حال حاضر، به خوبی می‌دانیم

مولف مسئول: حسن اکرمی- کرمانشاه: باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی E-mail: Hassan_akrami@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۶/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۶/۳۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۴/۲۸

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:36 IRST on Tuesday December 27th 2016

که جمعیتی متمایز و نادر از سلول‌ها به نام سلول‌های بنیادی سرطانی ((Cancer stem cells(CSCs) یا سلول‌های شروع کننده تومور در بین سایر سلول‌های توموری وجود دارند(۶) که در هر تومور بدخیم باعث رشد تومور(۷)، تهاجم موضعی و متاستاز به بافت‌های دور دست می‌شوند(۹،۸). هم‌چنین سلول‌های بنیادی سرطانی علاوه بر توانایی خود تجدیدی و تکثیر، رگ‌زایی تومور را نیز القا می‌کنند(۱۰). در مطالعه حاضر، تاثیر داروی ایبوپروفن بر روی قدرت رگ‌زایی سلول‌های بنیادی سرطان معده نسبت به سایر سلول‌های توموری بررسی شد.

مواد و روش ها

کشت سلول

در این مطالعه تجربی، رده سلولی سرطان معده MKN45 از موسسه انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت این رده سلولی از محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (Sigma) حاوی ۱۰ درصد سرم (Fetal Bovine Serum Gibco)، صد میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و صد میکرویونیت در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma) استفاده شد.

جداسازی سلول های بنیادی سرطانی از رده سلول والدی

۵۰۰۰۰ سلول از رده سلولی MKN45 که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند، به کمک تکنیک تریپان بلو شمارش شده و به فلاسک سلولی ۲۵ سانتی‌متری با چسبندگی کم (Low Attachment) که از قبل، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/F12 بدون سرم حاوی فاکتورهای رشد EGF ۵ng/ml، bFGF ۱۰ ng/ml و ۲ درصد B27 به آن اضافه شده بود، افزوده شد و به مدت ۲۱ روز در انکوباتور ۳۷°C با ۵ درصد دی اکسیدکربن (CO_2) و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفت(۱۱).

بررسی مقاومت دارویی

ابتدا تعداد ۴۰۰۰۰ سلول از رده سلولی سرطان معده و سلول‌های بنیادی سرطانی در هر خانه از ظرف ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. سپس سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار از ایبوپروفن (Sigma;Germani) به مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند. نهایتاً میزان زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش نوترال رد (Neutral Red) بررسی شد(۱۲).

مدل تشکیل لوله (Tube formation)

تعداد 5×10^5 سلول بنیادی سرطانی همراه با ۶۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی غلظت ۴۰۰ میکرومولار ایبوپروفن و یک نمونه به عنوان کنترل (با غلظت صفر ایبوپروفن)، به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. پس از ۲۴ ساعت از کشت، محیط رویی این سلول‌ها برداشته شد و به سلول‌های هوک (human umbilical vein endothelial cells) که به شرایط کشت فاقد سرم عادت کرده و سپس به تعداد ۲۰۰۰ سلول بر روی ماتریژل در ظرف ۱۲ خانه‌ای کشت داده شده بود، اضافه شد. نتایج حاصل پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها توسط میکروسکوپ (Olympus ،AX-71) ثبت شد.

یافته ها و بحث

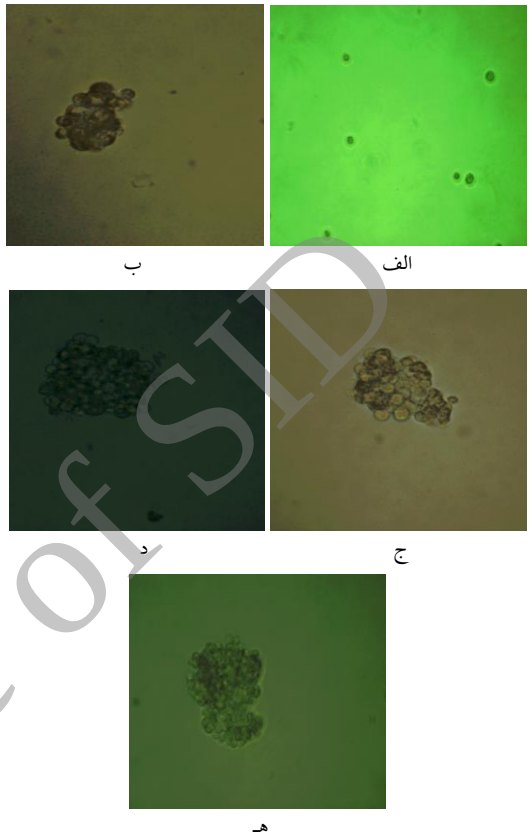
سلول‌های والدی MKN45 در محیط کشت فاقد سرم و حاوی فاکتور رشد به مدت سه هفته کشت داده شدند. سلول‌ها در شرایط کشت سه بعدی و غیر چسبنده رشد کردند و تشکیل اجسام کروی شکل دادند (تصویر شماره ۱). برای سنجش توانایی خود تجدیدی اجسام کروی، سلول‌های جداسازی شده از مرحله اول کشت به کمک سرنگ انسولین به صورت دانه‌دانه در آمده و سپس در محیط کشت فاقد سرم و حاوی فاکتور رشد و در شرایط کشت سه بعدی و غیر چسبنده مجدداً کشت شدند. سلول‌ها دوباره رشد کرده و تشکیل اجسام کروی شکل دادند. برای اثبات بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده، هم‌چنین بیان ژن‌های SOX2,CD44,OCT3/4، قدرت تمایز به دو رده سلول چربی و عصبی، توانایی

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:36 IRST on Tuesday December 27th 2016

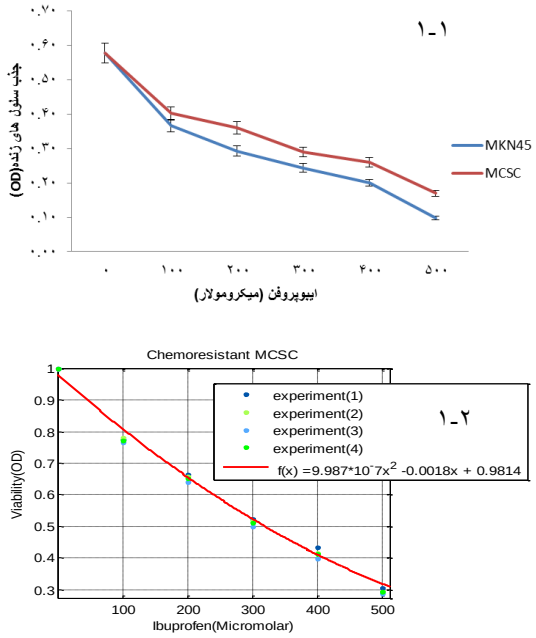
تهاجم و متاستاز و فعالیت متالوپروتئینازها در سلول‌های جداسازی شده نسبت به رده سلول والدی نیز بررسی شد. نتایج حاصل بیانگر بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده بود.



تصویر شماره ۱: مراحل جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی از رده سلولی سرطان معده MKN45. الف- رده سلولی MKN45 که به صورت دانه دانه از هم جدا شده‌اند و شکل‌های ب،ج،د،ه به ترتیب تشکیل کلونی در روزهای ۳، ۱۰، ۱۴ و ۲۱ بعد از کشت را نشان می دهند.

برای بررسی میزان مقاومت دارویی سلول‌های رده سلولی MKN45 و سلول‌های بنیادی سرطانی جداسازی شده از آن با غلظت‌های مختلفی از ایبوپروفن تیمار شد و پس از ۲۴ ساعت، میزان زنده ماندن سلول‌ها بررسی شد (نمودار شماره ۱ (۱-۱)). غلظتی از داروی ایبوپروفن که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، برای سلول‌های بنیادی سرطانی جداسازی شده از رده سلولی MKN45 با استفاده از نرم‌افزار متلب در حدود ۴۰۰ میکرومولار به دست آمد (نمودار شماره۱ (۲-۱)).

مقاومت دارویی



نمودار شماره ۱: مقاومت سلول های بنیادی سرطانی جداسازی شده از رده سلولیMKN45 تیمار شده با ایبوپروفن نسبت به رده سلول والدی

مطالعات گسترده ای در زمینه قدرت رگ‌زایی سلول‌های بنیادی سرطانی نسبت به سایر سلول‌های توموری انجام شده است که همگی گویای این مطلب هستند که قدرت رگ‌زایی در این سلول‌ها بیش‌تر از سایر سلول‌های توموری است.

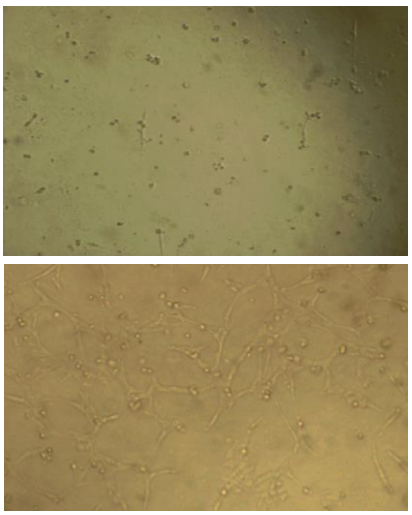
از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه Bao و همکارانش اشاره کرد که در نتیجه مشاهدات خود ذکر کردند که سلول‌های شبه بنیادی گلیوما CD133 منفی، در نزدیکی رگ‌های خونی یافت می‌شوند. در مقایسه با این سلول‌ها، سلول‌های شبه بنیادی گلیوما CD133 مثبت، تومورهایی با عروق خونی افزایش یافته، نکروز و خونریزی ایجاد می‌کند. هم‌چنین میزان بیان VEGF به عنوان اصلی‌ترین فاکتور رگ زایی، در این سلول‌ها ۲۰-۱۰ برابر بیش‌تر از سلول‌های CD133 منفی است(۱۳). یکی از مسیرهای سیگنالی مهم، سلول‌های بنیادی سرطانی و رگ‌زایی مسیر سیگنالی BMP1 است. BMP در حال حاضر مشخص شده است که در رگ‌زایی به عنوان یک مهارکننده نقش دارد. با توجه به گزارش Shao و

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:36 IRST on Tuesday December 27th 2016

همکارانش، BMP-9 بیان VEGF را به وسیله مسیر BMP-9/ALK1 سرکوب می‌کند و این در حالی است که مسیر TGF/ALK5، بیان VEGF و رگ‌زایی را افزایش می‌دهد. در بین این دو مسیر، نقش کلیدی تعادل، BMP است که می‌تواند صحت رگ‌زایی را حفظ کند(۱۴). در تحقیق حاضر برای بررسی توانایی داروی ایبوپروفن در کاهش توانایی رگ زایی سلول‌های بنیادی سرطانی از مدل تشکیل لوله استفاده شد که در نتیجه این بررسی مشخص شد که داروی ایبوپروفن در غلظت ۴۰۰ میکرومولار در سلول‌های بنیادی جداسازی شده از رده سلولی MKN45 در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به نمونه کنترل باعث کاهش زیادی در توانای رگ‌زایی این سلول‌ها شد.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که نتیجه‌گیری طبق مطالعات انجام شده، نقش سلول‌های بنیادی سرطانی در شروع و گسترش سرطان و هم‌چنین توانایی بیش‌تر این سلول‌ها در رگ‌زایی نسبت به سایر سلول‌های سرطانی مشخص شده است. از طرفی تاثیر داروی ایبوپروفن در پیش‌گیری و درمان برخی از سرطان‌ها و مهار رگ‌زایی نیز طی بررسی‌های گذشته گزارش شده است. در این مطالعه نیز تاثیر داروی ایبوپروفن بر توانایی رگ‌زایی سلول‌های بنیادی سرطان معده بررسی شد و به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان عنوان کرد که ایبوپروفن رگ‌زایی را در سلول‌های بنیادی سرطان معده کاهش می‌دهد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: تاثیر داروی ایبوپروفن بر روی قدرت رگ زایی سلول های بنیادی سرطان معده. الف- سلول های بنیادی سرطانی تیمار شده با غلظت ۴۰۰ میکرومولار ایبوپروفن. ب- سلول های بنیادی سرطانی کنترل با غلظت صفر ایبوپروفن

سپاسگزاری

از کلیه دوستان و همکاران محترمی که در انجام گرفتن این پروژه ما را یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Pountos I, Georgouli T, Bird H, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research 2011; 3(1): 19-27.
2. Harris R, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: A critical review of non-selective COX-2 blockade. Oncol Rep 2005; 13(4): 559-583.
3. Tarnawski A, Jones MK. Inhibition of angiogenesis by NSAIDs: molecular mechanisms and clinical implications. J Mol Med (Brel) 2003; 81(10): 627-636.
4. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. Oncogene 2003; 22(42): 6549-6556.
5. Yasui W, Oue N, Ito R, Kuraoka K, Nakayama H. Search for new biomarkers of Gastric Cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implications. Cancer Sci 2004; 95(5): 385-392.
6. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene 2004;

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 14:36 IRST on Tuesday December 27th 2016

23(43): 7274-7282.

7. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature 2001; 414(6859): 105–111.
8. Wicha MS. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds. Clin Cancer Res 2006; 12(19): 5606-5607.
9. Yang L, Ping yf, Yu X, Qian F, Guo ZJ, Qian C, et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. Cancer Lett 2011; 310(1): 46-52.
10. Zhao Y, Bao Q, Renner A, Camaj P, Eichhorn M, Ischenko I, et al. Cancer stem cells and angiogenesis. Int J Dev Biol 2011; 55(4-5): 477-482.
11. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. Stem Cells 2009; 27(5): 1006-1020.
12. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protoc 2008; 3(7): 1125-1131.
13. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006; 444(7120): 756-760.
14. Shao E, Lin L, Yao Y, Boström KI. Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. Blood 2009; 114(10): 2197-2206.

Archive of SID

www.SID.ir