Archive Of SID

مهار رشد رده سرطانی K562 با استفاده از کالپروتکتین (Calprotectin) نوترکیب انسانی در شرایط آزمایشگاهی

زهرا طاهری: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران. zahra_taheri_90@yahoo.com
*** امیر توکمه‌چی:** گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (* نویسنده مسئول). a.tukmachi@urmia.ac.ir
مجید نوجوان: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران. m.nojavan77@gmail.com
مهدی ایمانی: گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. mehdi_imani682@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۵

چکیده

زمینه و هدف: کالپروتکتین (Calprotectin) نوترکیب انسانی پروتئینی است که اثر مهاری بر رشد سلول‌های سرطانی دارد. این ترکیب می‌تواند به‌عنوان یک عامل درمانی یا مارکر در تشخیص سرطان مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضد توموری کالپروتکتین نوترکیب انسانی بر رده سرطانی K562 در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش کار: ابتدا کالپروتکتین در *E. coli* یکسان‌سازی و تلخیص شد. سپس غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم آن در میلی‌لیتر محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) تهیه و خواص سلول‌کشی آن در شرایط آزمایشگاهی علیه رده سرطانی K562 در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در حضور داروی دکسوروبیسین به‌عنوان شاهد مثبت به روش MTT سنجیده شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که کالپروتکتین نوترکیب دارای خاصیت ضد توموری در حالت وابسته به غلظت و زمان است و با افزایش غلظت و گذر زمان، سلول‌کشی آن افزایش پیدا می‌کند. بررسی‌های آماری نشان داد کالپروتکتین نوترکیب به‌طور معنی‌داری ($p=۰/۰۲۳۱$) اثر مهاری بر رده K562 دارد.

نتیجه‌گیری: بر اساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت کالپروتکتین دارای اثرات ضد توموری بوده ولی جهت کسب نتایج مطمئن انجام مطالعات بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: رده سرطانی K562، کالپروتکتین نوترکیب، اثرات ضد توموری

مقدمه

تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، علاوه بر ایجاد تحول عظیم در تولید مواد غذایی، در زمینه بهداشت نیز جهش شگرفی ایجاد کرده‌اند. انسولین انسانی (برای درمان دیابت) اولین دارویی بود که در سال ۱۹۸۲ به‌وسیله تکنیک‌های مهندسی ژنتیک به تولید انبوه رسید و به دنبال آن مهندسی ژنتیک همچنان به خلق داروهای جدید و واکسن‌ها ادامه داد. این داروها به میلیون‌ها انسان مبتلابه بیماری‌های قلبی، سرطان، دیابت، پارکینسون، آلزایمر، ایدز و غیره در سراسر جهان کمک کرده‌اند. داروهایی که از طریق روش‌های زیست‌فناوری تهیه می‌شوند در مقایسه با روش‌های شیمیایی به‌مراتب از اثرات زیان‌بار جانبی کمتری برخوردار هستند. همچنین زیست‌فناوری قادر به ساخت داروهایی پیچیده‌ای هست که به طریق دیگری نمی‌توان آن‌ها را تولید کرد. این در حالی است که برخی از آن‌ها در میان موفق‌ترین محصولات دارویی قرارگرفته‌اند. بیش از ۳۰ نوع پروتئین برای کاربردهای متنوع بالینی موجود است و بیش از ۳۰۰ پروتئین در حال گذراندن کارآزمایی‌های بالینی هستند (۱).

کالپروتکتین (Calprotectin)، پروتئینی هترودایمر بوده که توانایی اتصال به کلسیم (Ca^{+2}) و روی (Zn^{+2}) را دارد، این پروتئین از یک زنجیر سنگین و یک زنجیر سبک تشکیل شده است (۲-۴) و در حالت دیمر دارای وزن مولکولی برابر با ۲۴ کیلو دالتون می‌باشد (۵). این پروتئین اولین بار به وسیله Fagerho و همکاران (۶) از گرانولوسیت‌ها استخراج و پروتئین L1 نامیده شد،

www.SID.ir

Archive Of SID

سپس بر اساس خاصیت اتصال به کلسیم و خاصیت ضد باکتریایی این پروتئین، کالپروتکتین نامیده شد (۷). به علت آنکه اساساً در سلول‌های میلوئید بیان می‌شود به آن پروتئین وابسته به میلوئید ((Myeloid Related Protein (MRP) (MRP8/MRP14) نیز گفته می‌شود (۲) و از آنجایی که این پروتئین جزو خانواده S100 می‌باشد به آن (S100A8/S100A9) نیز اطلاق می‌گردد (۸). مهمترین منبع کالپروتکتین سیتوپلاسم سلول‌های نوتروفیلی است که در حدود ۳۰ الی ۶۰ درصد پروتئین سیتوزولی نوتروفیل را کالپروتکتین تشکیل می‌دهد. کالپروتکتین حدود پنج درصد از پروتئین‌های سیتوزول منوسیت را تشکیل می‌دهد (۹). این پروتئین علاوه بر سیتوزول نوتروفیل‌ها در غشا منوسیت‌ها نیز وجود دارد. به دنبال فعال شدن نوتروفیل‌ها یا اتصال منوسیت‌ها به سلول‌های اندوتلیال رگ‌های خونی، کالپروتکتین آزاد شده و میزان آن در سرم یا مایعات بدن بالا رفته و به‌عنوان یک شاخص مهم التهاب در نظر گرفته می‌شود (۱۰).

پس از آلودگی به ویروس HIV و سرطان غلظت پلاسمایی کالپروتکتین افزایش چشمگیری می‌یابد. میزان این پروتئین در مدفوع افراد مبتلا به بیماری‌های التهابی روده افزایش می‌یابد (۱۱-۱۴).

آزادسازی کالپروتکتین به وسیله یک مسیر ترشحی جدید که شامل پروتئین کیناز C است صورت می‌گیرد. کالپروتکتین‌هایی که به داخل سیتوزول رها می‌شوند انتهای N گلیکوزیله خود را از دست می‌دهند. بنابراین نمی‌توانند از غشا عبور کنند و کالپروتکتین خارج سلولی باید در اثر ریزش پروتئین از غشای سلول باشد. در نوتروفیل، آزاد شدن کالپروتکتین به خارج از سلول به دنبال تشکیل کمپلکس با اسید آراشیدونیک صورت می‌گیرد (۱۵).

کالپروتکتین اثر بازدارنده‌ای بر رشد سلول دارد و به نظر می‌رسد که قدرت بازدارندگی رشد سلولی این پروتئین با شروع تکثیر سلول رابطه مستقیم دارد (۱۶ و ۱۷). تحقیقات نشان داده است که کالپروتکتین از رشد و تکثیر مخمر *Candida albicans* و برخی از باکتری‌ها و سلول‌های سرطانی مختلف جلوگیری می‌نماید. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کالپروتکتین از رشد طیف وسیعی از دودمان‌های سلولی سرطان خون جلوگیری می‌کند. این پروتئین نه تنها اثر مهاری بر رشد سلول دارد بلکه همچنین دارای فعالیت کشندگی نیز (Cytotoxicity) است. فعالیت کشندگی کالپروتکتین در سلول‌های سرطانی نتیجه سمیت غیر انتخابی این پروتئین نیست. بلکه در عملکرد مهاری و فعالیت القاء مرگ سلولی این پروتئین یک وقفه زمانی نسبتا طولانی مشاهده می‌شود. این پروتئین فرایند مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوزیس (Apoptosis) را تحریک می‌کند (۱۸ و ۱۹).

از طرف دیگر پس از بیماری‌های قلبی و عروقی که سالانه، مرگ و میر افراد زیادی را در دنیا به خود اختصاص می‌دهند سرطان دومین علت مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته محسوب می‌گردد (۱۶). این بیماری در صورت عدم درمان کشنده است. سرطان خون یا لوسمی یکی از شناخته شده ترین انواع لوسمی‌ها محسوب می‌شود (۱۷). همچنین از جمله بدخیمی‌هایی است که طبق آمار جهانی سالانه ۱۰-۸ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر را مبتلا می‌سازد (۲۰). لوسمی نسبت به سایر انواع سرطان‌ها در خاورمیانه و مدیترانه شرقی شایع‌تر است و ۵٪ از کل سرطان‌های این مناطق را تشکیل می‌دهد (۲۱). لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) به دلیل یک جابه‌جایی دو طرفه بین ژن abl بر روی کروموزوم ۹ و ژن bcr بر روی کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توان بوجود می‌آید. نتیجه این جا به جایی تشکیل دورگه Abl-Bcr است، که پروتئین p210 ab1-bcr را کد می‌کند و باعث تکثیر بی‌رویه و نیز اختلال در آپوپتوزیس (Apoptosis؛ مرگ برنامه ریزی شده سلولی) می‌گردد (۲۲). این بیماری در اثر تکثیر و تکامل ناقص گویچه‌های سفید خون و پیش سازهای آن‌ها در خون و مغز استخوان ایجاد می‌شود. واژه لوسمی به معنی خون سفید بوده و یکی از چهار سرطان شایع در میان کودکان محسوب می‌شود. در بیماری لوسمی تولید طبیعی

www.SID.ir

Archive Of SID

گویچه‌های سفید خون متوقف شده و توانایی فرد در مقابله با بیماری‌ها از بین می‌رود. همچنین سلول‌های لوسمی تولید سایر سلول‌های خونی که توسط مغز استخوان ساخته می‌شوند (از جمله گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها) را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۳). سلول‌های سرطانی K562 جزء سلول‌های سرطانی خون با منشا میلوئیدی هستند که برای اولین بار از یک پیرزن ۵۳ ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جدا شد. بر اساس نوع گلبول سفید خون مبتلا می‌توان به لنفوسیتیک و میلوسیتیک و بر اساس نوع بیماری (میزان بلوغ سلول‌ها و زمان بقاء بیماران) به دو نوع به حاد و مزمن تقسیم می‌شود و بر این اساس چهار نوع لوسمی وجود دارد: Chronic Myeloid Leukemia (CML)، Acute Myeloid Leukemia (AML) ، Chronic Lymphoblastic Leukemia (CLL) و Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) (۲۳ و ۲۴). در حال حاضر بیشتر گزارش‌های موجود حاکی از فعالیت آنتی توموری کالپروتکتین می‌باشد. در همین ارتباط طبق تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاهی نشان داه شده است که کالپروتکتین قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی از جمله آدنوکارسینومای سینه انسان (MCF-7)، لوسمی انسانی، ملانومای خرگوش (Ros 17/2.8)، فیبروسارکومای موش (L-929)، آدنوکارسینومای سینه موش (MM46) می‌باشد (۲۵).

بررسی‌های انجام شده و مرور منابع علمی نشان می‌دهد که تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در زمینه خاصیت سلول کشی کالپروتکتین نوترکیب انسانی در سلول‌های توموری رده k562 انجام نشده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر سلول کالپروتکتین نوترکیب انسانی بر رده سلولی K562 می‌باشد.

روش کار

مطالعه حاضر به صورت آزمایشگاهی (in vitro) از دی ماه سال ۱۳۹۰ تا مهر ماه ۱۳۹۱ در پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه طی مراحل زیر انجام گرفت:

بیان و تخلیص S100A8 و S100A14: در این مطالعه ناقل دارای توالی کد کننده مونومرهای تشکیل دهنده کالپروتکتین به صورت هدیه توسط Claus Kerkhoff از بخش طب داخلی دانشگاه روستراک (Rosturk) آلمان تهیه شد. این ناقل pQE32 می‌باشد که دارای پروموتور T5 می‌باشد. توالی کد کننده S100A8 با شماره دسترسی NM-002964.4 و S100A9 با شماره دسترسی NM-002965.3 در NCBI قابل دسترسی است. این ناقل در باکتری *E. coli* سویه M15 به روش شیمیایی ترانسفورم و در محیط دارای آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین پرگنه‌های رشد یافته انتخاب شدند. به منظور القا پروتئین پرگنه‌های مثبت در ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت لوریل (Lauryl Broth) رشد داده شده، سپس زمانیکه نور جذبی در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۷ رسید توسط لاکتوز و Isopropyl β- D – thiogalactoside (IPTG) به ترتیب با غلظت‌های ۱۰ و ۱ میلی مولار به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ ºC و با دور ۲۲۰ rpm انکوبه و اجازه داده شد پروتئین بیان گردد (۲۶). بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سانتریفیوژ و رسوب حاصل در بافر فسفات حاوی مهارکننده‌های پروتئازها EDTA و PMSF به مدت ۳۰ ثانیه ۳۰ بار با سونیکاتور شکسته شدند تا محلول رویی برای تخلیص پروتئین مورد استفاده قرار گیرد.

تخلیص پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون نیکل سفارز و طی یک مرحله انجام گرفت. بعد از تخلیص پروتئین‌ها، غلظت آنها به روش برادفورد (۲۲) سنجیده شد و به نسبت ۱ به ۱ با محلول پروتئینی مخلوط شدند و سپس مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه غلظت‌های مختلف از کالپروتکتین نوترکیب

در این مطالعه پس از تعیین غلظت پروتئین موجود در کالپروتکتین نوترکیب با روش براد فورد با استفاده از محیط کشت Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) (Gibco, England) رقت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت تهیه شد (۲۷).

www.SID.ir

Archive Of SID

تهیه سلول سرطانی و کشت آن: رده سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (C122) تهیه و در محیط کشت RPMI در حضور ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco, England)، ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در انکوباتور با ۵٪ گاز CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (۲۸).

سنجش خاصیت ضد توموری کالپروتکتین نوترکیب با روش 3-(4,5-Dimethyl Thiazol-2-yl-2,5-Diphenyl (MTT): در این مطالعه برای سنجش خاصیت ضد توموری کالپروتکتین نوترکیب انسانی از روش Chang و همکاران (۲۶) استفاده شد. به طور خلاصه، پس از سانتریفوژ و شمارش سلول‌های K562 به روش تریپان بلو، مقدار ۱۰۰ µl (با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵ درصد FBS به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی رقت‌های مختلف کالپروتکتین به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و به هر کدام ۱۰۰ µl سلول به همراه ۹۰ µl محیط کشت و ۱۰ µl بافر لیز کننده افزوده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها به ترتیب به مدت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۵٪ گاز CO_2 گرم خانه گذاری شدند.

پس از پایان زمان انکوباسیون ۱۰ µl از محلول MTT (۵ mg/ml از ۳-۴ و ۵ دی متیل تیازول ۲-۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید در بافر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و میکروپلیت به مدت چهار ساعت گرم خانه گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های سالم و زنده، برم موجود در محلول MTT را احیاء کرده و آن را به صورت ذرات نا محلول بنفش رنگ فورمازان (Furmazan) در می‌آورد. در پایان کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ µl محلول Dimethyl Sulfuxide (DMSO) خالص به چاهک‌ها و قرار دادن پلیت‌ها به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در انکوباتور شیکردار حل شدند و سرانجام شدت نور جذب شده (Optical Density) در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (StatFax, USA) ثبت گردید. درصد سلول کشی عصاره‌ها طبق فرمول زیر محاسبه شد:

درصد سلول کشی =

[جذب نوری شاهد ÷ (جذب نوری شاهد-جذب نوری نمونه)] ×۱۰۰

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرم افزار SPSS (نسخه۱۸) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی دار آزمون $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که کالپروتکتین نوترکیب در مقایسه با گروه شاهد که هیچ غلظتی از کالپروتکتین نوترکیب را دریافت نکرده بودند دارای فعالیت سلول‌کشی است.

جدول ۱- مقایسه میزان سلول‌کشی غلظت‌های مختلف کالپروتکتین نوترکیب در زمانهای ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت

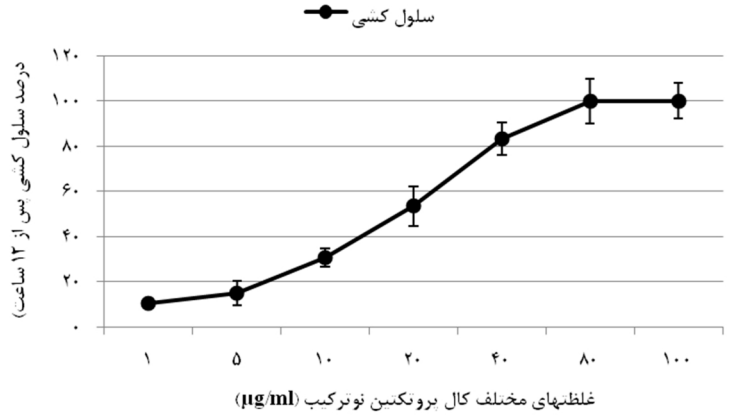
غلظت (µg/ml) کالپروتکتین	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
۱۰۰	۱۰۰ ± ۱۸/۷۱[a]	۶۴/۲۲ ± ۱۳/۲۴[b]	۷۰/۹ ± ۱۴/۹۸[b]
۸۰	۱۰۰ ± ۱۱/۱۳[a]	۸۳/۶۳ ± ۱۱/۸۷[a]	۷۵ ± ۱۱/۵[a]
۴۰	۸۳/۲۶ ± ۴/۴۸[b]	۷۴/۱۶ ± ۹/۱۹[c]	۶۵/۰۲ ± ۱۱[c]
۲۰	۵۳/۳۴ ± ۵/۰۸[c]	۶۳/۸۷ ± ۴/۲۲[d]	۵۹/۵۲ ± ۳/۴۵[d]
۱۰	۳۰/۵۷ ± ۴/۹۴[d]	۵۸/۷۲ ± ۴/۸۸[d]	۲۵/۲۳ ± ۶/۱۲[e]
۵	۱۴/۷۵ ± ۰/۰۸[e]	۳۸/۹۲ ± ۶/۱۶[e]	۱۹/۷۷ ± ۶/۸۳[f]
۱	۱۰/۴۹ ± ۰/۰۲[e]	۹/۲۶ ± ۰/ ۰۱[f]	۹/۲۱ ± ۰/۰۳[g]

* اعداد به صورت Mean ± Standard Deviation آورده شده‌اند.

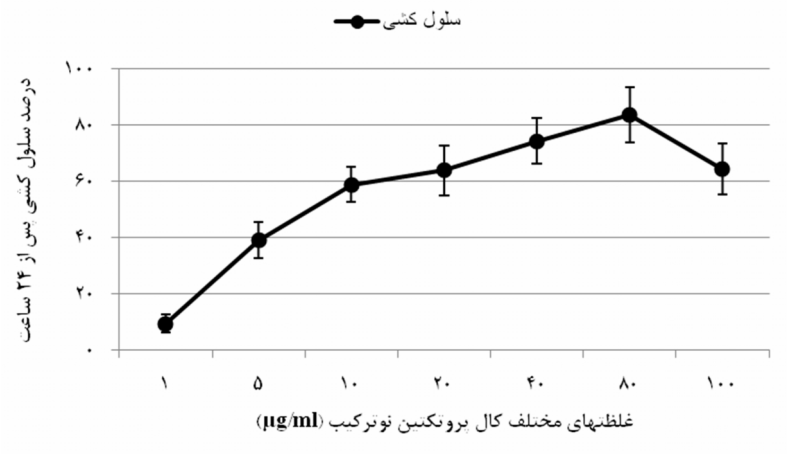
* حروف غیر یکسان در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($p<۰/۰۵$) با آزمون آنالیز واریانس یکطرفه می‌باشند.

www.SID.ir

Archive Of SID



نمودار ۱- میزان سلول‌کشی غلظت‌های مختلف کالپروتکتین نوترکیب بعد از ۱۲ ساعت



نمودار ۲- میزان سلول‌کشی غلظت‌های مختلف کالپروتکتین نوترکیب بعد از ۲۴ ساعت

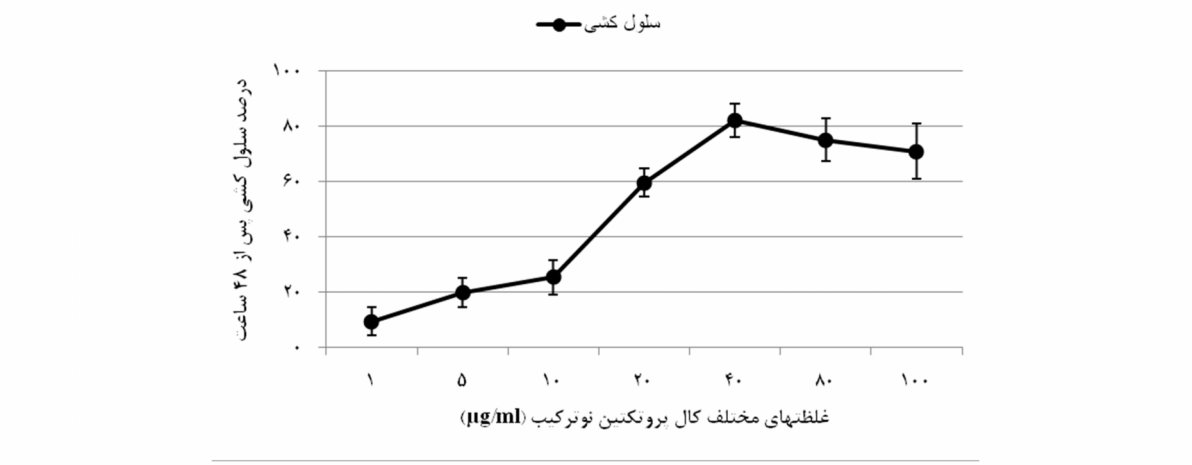
همچنین بر اساس این نتایج با افزایش غلظت کال پروتکتین، میزان سلول‌کشی افزایش می‌یابد، لذا می‌توان گفت که فعالیت سلول‌کشی کالپروتکتین نوترکیب وابسته به غلظت است. این حالت در تمامی زمان‌های ۱۲ ساعت (نمودار ۱)، ۲۴ساعت (نمودار ۲) و ۴۸ ساعت (نمودار ۳) مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل، فعالیت سلول‌کشی کالپروتکتین وابسته به زمان نیز می‌باشد و با گذر زمان، فعالیت سلول‌کشی آن افزایش می‌یابد. همچنین جدول ۱ مقایسه میزان سلول‌کشی غلظت‌های مختلف کالپروتکتین نوترکیب را در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهد. در زمان ۱۲ ساعته، غلظت ۱۰۰ µg/ml کالپروتکتین نوترکیب، از نظر آماری دارای اختلاف معنادار (P=۰/۰۲۳۱) با سایر غلظت‌ها بود. در زمان ۲۴ ساعته، غلظت ۸۰ µg/ml کالپروتکتین نوترکیب، از نظر آماری دارای اختلاف معنادار (P=۰/۰۱۵) با سایر غلظت‌ها بود و در زمان ۴۸ ساعته، غلظت ۴۰ µg/ml کالپروتکتین نوترکیب، از نظر آماری دارای اختلاف معنادار (P=۰/۰۳۰۹) با سایر غلظت‌ها بود.

بحث و نتیجه گیری

سرطان یکی از عمده ترین علل مرگ و میر در جهان است و به طور معمول به‌عنوان رشد کنترل نشده سلول‌ها تعریف می‌شود. نگهداری هموستازی بافت‌های طبیعی پستانداران شامل یک تعادل بین تکثیر و مرگ سلولی می‌باشد هر عامل داخلی یا

www.SID.ir

Archive Of SID



نمودار ۳- میزان سلول‌کشی غلظت‌های مختلف کالپروتکتین نوترکیب بعد از ۴۸ ساعت

خارجی که باعث اختلال در این تعادل گردد نتیجه آن ابتلا به سرطان می‌باشد (۳۵-۳۴). علی‌رغم تحقیقات فراوان برای یافتن داروهای سالم هنوز شیمی درمانی اصلی ترین روش معالجه سرطان محسوب می‌گردد. شیمی درمانی دارای عوارض اجتناب ناپذیری است از این رو شناسایی روش درمانی جایگزین از اولویت‌های تحقیقات پزشکی بوده است. همچنین داروهایی که برای درمان لوسمی به کار می‌روند، اغلب به دلیل مقاومت دارویی باعث عدم تاثیر و در نهایت مرگ بیمار می‌شوند (۲۸ و ۲۹). بنابراین مطالعات جهانی وسیعی برای یافتن داروهای جدید با به کارگیری رده‌های سلولی در جریان است برای مثال در این زمینه می‌توان به بررسی‌های گوناگونی اشاره کرد که پیرامون مهار رشد رده سرطانی K562 انجام شده است.

Li-Xian و همکاران (۳۰) تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره زرد چوبه را در شرایط آزمایشگاهی بر رده سرطانی K562 بررسی کردند. آنها دریافتند که عصاره زرد چوبه باعث مهار رشد رده سرطانی K562 می‌شود که این مهار رشد وابسته به غلظت دارو می‌باشد. در مطالعه دیگری Gaoa و همکاران (۳۱) با بررسی تاثیر عصاره گیاه *Goldfussia psilostachys* بر رده سرطانی K562 دریافتند که عصاره اتانولی این گیاه مانع رشد سلول های K562 می‌شود و این عمل را از طریق اختلال در چرخه میتوز انجام می‌دهد.

در مطالعه دیگری Yan-Li و همکاران (۳۶) نشان دادند که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در گیاه *Lysimachia clethroides* می‌توانند تکثیر رده K562 را مهار نمایند. از جمله ترکیبات طبیعی دیگری که دارای خواص ضد توموری علیه K562 می‌باشد، می‌توان به اسید گاما لینوئیک (۳۷)، کورکومین (۳۸)، دگولین جدا شده از نخود (۳۹) و امودین جدا شده از گیاه ریواس (۴۰) اشاره کرد. این ترکیبات قادر هستند در شرایط آزمایشگاهی رشد رده سرطانی K562 را بسته به غلظت، مهار و سبب القاء آپوپتوز در آن گردند.

خاصیت ضد توموری کال پروتکین انسانی و همچنین کالپروتکتین نوترکیب انسانی، به اثبات رسیده است. کال پروتکتین، پروتئینی است هترودیمر که توانایی اتصال به کلسیم و روی را دارد. این پروتئین در سیتوزول نوتروفیل‌ها و در غشاء مونوسیت‌ها وجود دارد (۴۱). وظایف متنوع و گوناگونی برای کال پرتکتین پیشنهاد شده است ولی بارزترین وظیفه کال پروتکتین فرآیند مهار رشد سلولی است. این پروتئین رشد سلول‌های پروکاریوتی و انواع یوکاریوتی، به ویژه سلول‌های سرطانی را به طور مؤثر و توانمند مهار می‌کند (۴۲). در این راستا Yui و همکاران (۳۲) تاثیر غلظت‌های مختلف کالپروتکتین نوترکیب انسانی را بر مهار رشد رده سلولی LE-4 بررسی کردند. آنها دریافتند که سلول کشی rhMRP14 بر علیه رده سلولی EL-4 ابتدا در غلظت ۱۰ میکرومولار

www.SID.ir

Archive Of SID

مشخص شد در حالیکه rhMRP8 باعث سلول کشی در ۴۰ میکرومولار باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. در نهایت ترکیبی از هر دو پروتئین (rhMRP8 و rhMRP14) فعالیت سلول کشی بیشتری را نشان داد (شروع سلول کشی از ۵ میکرومولار). آنها دریافتند که کالپروتکتین نوترکیب انسانی به‌عنوان عامل موثر در القاء مرگ سلولی شناخته شده‌اند و از طریق لیز غشاء سلول مورد نظر عمل خود را انجام می‌دهند. همچنین در مطالعه دیگری که توسط قوامی و همکاران (۴۳) صورت گرفت نشان داده شد که کالپروتکتین دارای اثر سمیت بر دو رده سلولی کارسینوما و آدنوکارسینومای کولون (SW742) و(HT29/219) می‌باشد. آن‌ها دریافتند که کالپروتکتین باعث القاء مرگ سلولی از طریق فعال شدن کاسپاز به خصوص از طریق مسیر میتوکندریایی می‌شود. بررسی سمیت کالپروتکتین با استفاده از روش MTT مشخص شد که غلظت‌های بالاتر از µg/ml ۸۰ در زمان ۱۲ ساعت دارای اثر سلول کشی بر رده سلولی HT29/219 می‌باشد. افزایش زمان انکوباسیون (۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۰ ساعت) رابطه معکوسی با تاثیرگذاری سمیت کالپروتکتین دارد در واقع با افزایش زمان انکوباسیون، تاثیر پذیری کالپروتکتین کاهش می‌یابد. کالپروتکتین باعث القاء مرگ سلولی قابل توجهی در رده سلولی SW742 در تمامی غلظت‌ها در طول زمان‌های مورد نظر شد. فعالیت القاء آپوپتوز از طریق فعال شدن کاسپاز ۳ و ۹ در هر دو رده سلولی بود. نتایج نشان داد علاوه بر فعال شدن کاسپاز ۳ و ۹ در هر دو رده سلولی، یک افزایش جزئی در فعال شدن کاسپاز ۸ هم مشاهده شد که فعالیت این کاسپاز فقط در غلظت های بالاتر از µg/ml ۱۲۰ بود. در تحقیق دیگری که توسط یوسفی و همکاران (۳۳) بر القاء آپوپتوز توسط، کالپروتکتین انسانی در رده سلولی K562 صورت گرفت، بررسی و آنالیز تکثیر سلولی نشان داد که کالپروتکتین انسانی می‌تواند به صورت وابسته به غلظت باعث جلوگیری از رشد سلول‌های توموری گردد (۳۸). شکرگزار و همکاران (۱۳۸۵) با تحقیق پیرامون سلول‌های AGS (سرطانی) و HGF (سالم) نشان دادند که درصد بقای سلول‌ها با افزایش غلظت کالپروتکتین کاهش می‌یابد، طوری که در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر این میزان بعد از ۲۴ ساعت به صفر می‌رسد نتایج حاصل از اثر کالپروتکتین بر سلول‌های AGS و HGF بر اثر مهاری بیشتر کالپروتکتین بر روی سلول‌های سرطانی گواهی می‌دهد (۳۴).

Nakatani و همکاران (۴۸) با بررسی فعالیت القاء آپوپتوز بر سه رده سلولی شامل سلول‌های سرطانی غدد تیموس موش (EL-4)، رده سلولی سرطانی لنفوبلاستی حاد انسانی (MOLT-4) و سلول‌های سرطانی کبد موش (MH134) توسط کالپروتکتین دریافتند که این پروتئین دارای خاصیت سلول کشی علیه سه رده مورد مطالعه بود.

در مطالعه حاضر خاصیت ضد سرطانی کالپروتکتین نوترکیب انسانی علیه رده سلولی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بررسی گردید. یافته‌های این بررسی نشان داد که کالپروتکتین نوترکیب می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند که این مهار وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت میزان مهار نیز افزایش یافت. همچنین مهار رشد رده سرطانی K562 توسط کالپروتکتین نوترکیب وابسته به زمان نیز، می‌باشد. به طوری که با گذر زمان میزان مهار رشد سلولی افزایش می‌یافت. و همچنین مشخص شد که کالپروتکتین نوترکیب انسانی می تواند به طور معنی داری ($P<0/05$) رشد رده K562 را مهار نماید. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده توسط Satoru Yui و همکاران که نشان دادند کالپروتکتین نوترکیب انسانی می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی EL-4 را در حالت وابسته به غلظت و زمان مهار نمایند، همخوانی دارد. مرور منابع علمی نشان داد که تا کنون هیچگونه تحقیقی در خصوص تاثیر کالپروتکتین نوترکیب انسانی بر رده سلولی K562 در شرایط *in vitro* صورت نگرفته است. همچنین مطالعات صورت گرفته نشان می دهد که کالپروتکتین نوترکیب می تواند به درون سلول ها نفوذ کرده و باعث مرگ سلول‌های سرطانی شود. از جمله محدودیت‌های

www.SID.ir

Archive Of SID

این پژوهش کمبود منابع در خصوص کالپروتکتین نوترکیب جهت مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعات قبلی از محدودیت های این پژوهش به شمار می‌آید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه و دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ابراز می‌دارند.

منابع

1. Hojati Z, Dehghanian F, Kamali A, Shadbakhsh Sh. Recombinant Reptilase. Tashkhis Azmeyeshghahy 2012;76-78:27-35.
2. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo J, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. Nature 1987;330:80-2.
3. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? J Clin Pathol Mol Pathol 1996;49:74-9.
4. Zwadlo G, Bruggen J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. Clin Exp Immunol 1988;72:510-5.
5. Striz I, Trebichavsky I. Calprotectin a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. Physiol Res 2004;53:245-53.
6. Fagerhol MK, Dale I, Andersen I. Release and quantitation of a leukocyte derived protein (L1). Scand J Haematol 1980;24:393-8.
7. Steinbakk M, Naess-Andresen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. Lancet 1990;336:763-5.
8. Que ML, Andersen E, Mombelli A. Myeloid-related protein (MRP)8/14 (calprotectin) and its subunits MRP8 and MRP14 in plaque-induced early gingival inflammation. J Clin Periodontol 2004;31:978-84.
9. Hessian PA, Edgeworth J, Hogg N. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca2+-binding proteins of neutrophils and monocytes. J Leukoc Biol 1993;53:197-204.
10. Rammes S, Kewitz G, Versmold H, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin dependent pathway. Pediatr Allergy Immunol 1997;8:153-5.
11. Yui S, Nakatani Y, Mikamim M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an Inflammatory Protein Complex from Neutrophils with a Broad Apoptosis-Inducing Activity. Biol Pharm Bull 2003;26(6):753-760.
12. Ghavami S, Kerkhoff C. Mechanism of apoptosis induced by s100A8/A9 in colon cancer cell lines; the role of ROS and the effect of metal ions. J Leuk Biol 2004;76(6):169-175.
13. Nakatani Y, Yamazaki M, Walter J, Chazin WJ, Yui S. Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosisinducing activity mediators. Inflammation 2005;5:280-292.
14. Poullis A, Irwin AG, Dearing M, Gordon C, Britten AJ, Heenan S, et al. Repeat planar white cell scanning to monitor short-term therapy of active inflammatory bowel disease: a methodological study and comparison with clinical scores and novel inflammatory markers. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006;18(6):607-614.
15. Karen F, Mark C. Calprotectin expression by gingival epithelial cells. Infec Immun 2001;69(5):3248.3254
16. Ishikawa K, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J. The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 resolutions. Acta Cryst 2000;56:559-566.
17. Nacken W, Roth J, Sorg C, Kerkhoff C. S100A/S100A8: Myeloid representative of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. Mic Res Tech 2003;60:569-580.
18. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100 A8/S100 A9), An inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis–inducing activity. Biol Pharm Bull 2003;26(6):753-60 .
19. Ten Bosch GJA, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJM, Leeksma OC. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human $CD34^+$ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. Blood 1996;88:3522-27.
20. Yui S, Mikami M, Yamazaki M. Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. J Leukoc Biol 1995;58(6):650-658.
21. Nacken W, Kerkhoff C. The hetero-oligomeric complex of the S100A8/S100A9 protein is extremely protease resistant. FEBS Letters 2007;581 5127–5130
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 1976;72:248-

www.SID.ir

Archive Of SID

Biochimica et Biophysica Sinica 2007;39(10):795-802.

34. Go VL, Wong DA, Butrum WL, Wong DA, Butrum R. Diet, nutrient and cancer preventation, Nutrition 2001;139: 3121-3126.

35. Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. Molecular biology of cancer. First edition, Bios scientific Publishers. United Kingdom. 2004, 6-10.

36. Yan-li L, Li-hua T, Zhong-qin L, Ben-gang Y, Shilin Y. Growth inhibitory and apoptosis inducing by effects of total flavonoids from Lysimachia clethroides Duby in human chronic myeloid leukemia K562 cells, Journal of Ethnopharmacology 2010;131: 1-9.

37. Haitao GE, Xiuqin K, Limei S, Lijuan H, Zhili L, Ping L. Gamma-linolenic acid induces apoptosis and lipid peroxidation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells, Cell Biology International 2009;33: 402-410.

38. Xie J, Que W, Chen M, Sun J, Liu T, Liu H, et al. Antitumor effects of curcumas in human chronic myeloid leukemia occur through cell cycle arrest and decrease the Bcl-2/Bax ratio to induce apoptosis, African Journal of Pharmacy and Pharmacology., 2011;5: 985-992.

39. Qiuling WU, Yan C, Hongli L, Jing HE. Anti-cancer Effects of Deguelin on Human Leukemia K562 and K562/ADM Cells In Vitro, Journal of Huazhong University of Science and Technology 2007;27: 149-152.

40. Chun-Guang W, Jun-Quang Y, Bei-Zhong L, Dan-Ting J, Chong W, Liang Z, et al. Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo, European Journal of Pharmacology 2010;627: 33-41.

41. Donato R. "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins." Microsc Res Tech 2003;60(6): 540-551.

42. Ailles L, Prince M. "Cancer stems cells in head and neck squamous cell carcinoma." Methods Mol Biol 2009;568: 175-193.

43. Ghavami S, Karami Tehrani F, Hashemi M, Nikoogoftar Zarif M. Possible Involvement of aspecific cell surface receptor for calprotectin-induced apoptosis in colon adenocarcinoma and carcinoma cell lines (SW742 and HT 29/219). Journal of Sciences Islamic Republic of Iran 2004; 15: 3-11.

44. Nakatani Y, Yamazaki M, Chazin W, Yui S. Regulation of S100A8/9 (Calprotectin) Binding to Tumor Cells by Zinc lon and Its Implication for Apoptosis-Inducing Activity. Biol Pharm Bull 2005;26(6):753–760.

45. Shokrgozar MA, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Moghadamnia SH. Evaluation of Proliferation Inhibition Effect of Human Calprotectin on Human Gastric Cancer Cell Line (AGS) in vitro. Cell J (Yakhteh) 2007;8(4):258-264. [Persian]

254.

23. Magnelli P, Cipollo JF, Abeijon C. A refined method for the determination of Saccharomyces cerevisiae cell wall composition and beta-(1, 6)-Dglucan fine structure. Anal Biochem 2001, 301: 136-150.

24. Kabiri F, Nejati V, Tukmechi A, Delirezh N, Nikbakhsh P. Inhibitiory properties of cytoplasmic extract of Lactobacilli isolated from common carp intestine on human chronic myelocytic leukemia K562 cell line: an in vitro study. TUMJ 2011;68:691-698. [Persian]

25. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. Embolism J 2001;20:6877-6888.

26. Chang KH, Park JS, Choi JH, Kim CJ, Paik HD. Cytotoxic effects of partially purified substances from Bacillus polyfermenticus SCD supernatant toward a Varity of tumor cell lines. Food Sci Biotechnol 2007;16:163-166.

27. Sun LR, Li X, Cheng YN, Yuan HY, Chen MH, Tang W. Reversal effect of substituted 1, 3-dimethyl-1Hquinoxalin- 2-ones on multidrug resistance in adriamycin resistant K562/A02 cells. Biomed Pharmaco Ther 2009;63:202-208.

28. Tepler I, Elias L, Smith JW, Hussein M, Rosen G, Chang AY, et al. A randomized placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy. Blood 1996;(87):3607- 3614.

29. Rahmani M, Nguyen TK, Dent P, Grant S. The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly Imatinib Mesylate-resistant Bcr/Abl+ human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation. Mol Pharmacol 2007; 72: 788-95.

30. Li-Xian WU, Jian-Hua XU, Guo-Hua WU, Yuan-Zhong C. Inhibitory effect of curcumin on proliferation of K562 cells involoes down-regulation of $p10^{bcr/abl}$-initiated Ras signal transducation pathway. Acta Pharmacol Sin 2003;24(11):1155-1160.

31. Gaoa X, Zhang G, Zhoua M, Luoa D, Lia B. Antiproliferative activity of Goldfussia psilostachys ethanol extract on K562 leukemia cells. Fitoterapia 2004;75:639-644.

32. Yui S, Nakatani Y, Michael J, Hunter WJ, Yamazaki C, Yamazaki M. Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. Taylor Francis health Scie 2002; 11:165-172.

33. Yousefi R, Imani M, Kardestani S, Saboury A, Gheibi N, Ranjbar B. Effect of Calcium and Zinc on its secondary and Tartary Structures and Role of Ph in its Thermal Stability. Acta

www.SID.ir

Archive Of SID

Original Article http://rjms.iums.ac.ir

In vitro Inhibitory Effect of Recombinant Human Calprotectin on K562 Cell Line

Zahra Taheri, Department of Biology, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran. zahra_taheri_90@yahoo.com
Amir Tukmechi, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Animals Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.
3 Majid Nojavan, Department of Biology, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran. m.nojavan77@gmail.com
***Mehdi Imani**, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran mehdi_imani682@yahoo.com (*Corresponding author). a.tukmachi@urmia.ac.ir

Abstract

Background: Recombinant human Calprotectin is a protein that has inhibitory effect on the growth of cancer. This substance could use as a marker or therapeutic agents for cancer. The goal of this study was to evaluate the anti-tumor property of recombinant human Calprotectin on K562 cell line.

Methods: Recombinant human Calprotectin was cloned and purified in E. coli. Then, different concentrations (1, 5, 10, 20, 40, 80 and 100 µg/ml) were prepared in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) and its antitumor property against K562 was assayed by MTT method at the presence of Doxorubicin as positive standard.

Results: Results showed recombinant human Calprotectin has antitumor property against K562 cell line in a concentration and time dependent manner. Statistical analysis revealed recombinant human Calprotectin significantly (P= 0.0231) has inhibitory effect on the growth on K562.

Conclusion: Based on this finding we conclude that recombinant human Calprotectin has anti-cancer properties, but its application needs further studies.

Keywords: K562, Recombinant human Calprotectin, Anticancer properties

www.SID.ir