ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۱۲، اسفند ۱۳۹۴(شماره پی در پی۱۰۷)

مقاله پژوهشی

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

اثرات ضد تکثیری و آپوپتوزی داروی پروپرانولول روی سلول‌های سرطانی رده K562

سپیده باستانی، مهدی محمدزاده*، یعقوب پاژنگ

گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از گیرنده‌های مربوط به سرطان و استرس، گیرنده‌های بتا آدرنرژیک هستند. فعالیت درمانی داروی ضد استرس پروپرانولول که در درمان بیماری‌های قلبی از جمله فشار خون بالا استفاده می‌گردد، به بلوکه کردن گیرنده‌های بتا آدرنرژیک مربوط می‌شود. هدف این مطالعه بررسی اثر داروی پروپرانولول بر روی رشد و تکثیر رده‌ی سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بود.

روش بررسی: در مطالعه تجربی حاضر تعداد ۱۰ میلیون سلول K562 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 کشت داده شدند. سپس غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار (به ترتیب ۶/۵، ۱۳، ۱۹/۵ و ۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از داروی پروپرانولول تهیه شد. سلول‌ها در شش گروه سه تایی؛ کنترل، تیمار شده با DMSO (دی‌متیل سولفوکساید) و تیمار شده با داروی پروپرانولول با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دارو، با استفاده از روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) درصد مهاری داروی مورد نظر روی بقای رده‌ی سلول‌های سرطانی K562 در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) سنجیده شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. سپس IC50 دارو نیز تعیین گردید. برای بررسی آپوپتوز از آزمون قطعه قطعه شدن DNA به روش الکتروفورز و روش رنگ‌آمیزی DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری تی دانشجویی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: داروی پروپرانولول باعث کاهش قدرت بقاء سلول‌های K562 شد و این اثر وابسته به زمان و غلظت بود، به طوری که اثر مهاری داروی پروپرانولول در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و ۷۲ ساعت پس از تیمار، بیشترین میزان بود و به طور معنی‌دار رشد رده K562 را مهار کرد ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: داروی پروپرانولول موجب مهار تکثیر و القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی رده K562 می‌شود. با توجه به این یافته‌ها، ممکن است بتوان از این دارو در زمینه‌های تحقیقاتی درمان سرطان استفاده کرد، اما نیاز به بررسی‌های آزمایشگاهی بیشتری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: رده‌ی سلولی K562، گیرنده بتا آدرنرژیک، پروپرانولول، مرگ سلولی

***نویسنده مسئول**: **مهدی محمدزاده**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

مقدمه

طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی[۱]، سرطان یکی از اصلی‌ترین عوامل مرگ‌ومیر در جهان به شمار می‌رود(۱). میزان وقوع سرطان به طور روز افزون از ۱۰ میلیون مورد در سال ۲۰۰۰ به ۱۵ میلیون مورد در سال ۲۰۲۰ در حال افزایش است(۲). امروزه بیش از ۱۰۰ نوع مختلف از سرطان در دنیا شناخته شده است که از میان آنها، لوسمی[۲] یا سرطان خون یکی از انواع شایع و مهلک سرطان‌ها است(۳). سرطان‌های خون با توجه به منشأ سلولی به میلوئید و لنفوئید و با توجه به سیر بیماری به مزمن و حاد تقسیم‌بندی می‌شوند. بر این اساس سرطان خون به چهار گروه طبقه‌بندی می‌گردد که شامل؛ لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لوسمی میلوبلاستیک حاد، لوسمی لنفوبلاستیک مزمن و لوسمی میلوبلاستیک مزمن است(۴). لوسمی میلوئیدی مزمن یکی از شناخته شده-ترین انواع لوسمی است که به دلیل یک جابه‌جایی دو طرفه بین ژن abl در کروموزوم ۹ و ژن Bcr موجود در کروموزوم ۲۲ در سلول‌های بنیادی چند توان به وجود می‌آید. نتیجه این جابه‌جایی کروموزومی منجر به شکل‌گیری ژن الحاقی Abl-Bcr می‌شود(۶ و ۵). این جابه‌جایی هم‌چنین با نام کروموزوم فیلادلفیا نیز شناخته می‌شود که در بیش از ۹۵ درصد از بیماران مثبت است(۸ و ۷). محصول این ژن الحاقی در CML[۳] پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی P210 Bcr-Abl می‌باشد که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم می‌باشد. این پروتئین باعث تکثیر بی‌رویه سلول‌های رده میلوئیدی و اختلال در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز)[۴] می‌گردد(۵). تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به شیمی‌درمانی، درمان با اینترفرون آلفا، پیوند مغز استخوان و درمان‌های ترکیبی اشاره کرد(۹). اغلب داروهای رایج ضد سرطانی اساساً داروهای سایتوتوکسیک هستند که معمولاً بر اساس ظرفیت مهار رشد سرطان در سیستم‌های آزمایشی طراحی شده‌اند. هم‌چنین آن‌ها سلول‌های طبیعی را به دلیل ایجاد اثرات نامطلوب جدی مانند مهار عملکرد مغز استخوان، تهوع و استفراغ و سایر اثرات توکسیسیتی تحت تأثیر قرار می‌دهند. یک استراتژی توسعه دارویی جایگزین، استفاده از داروهای ساخته شده‌ای است که قبلاً برای درمان بیماری‌های غیرسرطانی مورد پذیرش قرار گرفته‌اند و هدف‌های سلولی ویژه سرطانی شناخته شده‌ای دارند.[۱] مزیت اصلی این روش این است که پروفایل‌های فارماکوکینتیکی، فارماکودینامیکی و توکسیسیتی این داروها در اصل به خوبی شناخته شده‌اند، بنابراین می‌توان سریع‌تر وارد فازهای مطالعات بالینی II و III شد. از جمله این داروها می‌توان به داروهای ضد استرس مانند پروپرانولول[۵] اشاره کرد(۲). پروپرانولول اولین بلوکه کننده بتای مفید از نظر بالینی

1- World Health Organization (WHO)
2-Leukemia
3-chronic myelocytic leukemia(CML)
4-Apoptosis
5- Propranolol

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

است که به وسیله جیمز بلک ابداع شد و برای گیرنده-های آدرنرژیک β_1 و β_2 غیرانتخابی[1] است(۱۰ و ۱۱). این دارو برای درمان فشارخون، آنژین، آریتمی‌های قلبی و برخی شرایط نورولوژیکی تجویز می‌شود. مشاهده شده است که پروپرانولول اثرات ضد رگزایی[2] و ضد توموری مواد شیمی‌درمانی را افزایش می‌دهد. پروپرانولول تکثیر سلول سرطانی پانکراس را با بلوکه کردن مسیر پیام‌رسانی **گیرنده بتا آدرنرژیک** و القای آپوپتوز مهار می‌کند(۲). گیرنده‌های بتا آدرنرژیک یکی از گیرنده‌های مرتبط با سرطان و استرس است(۱۲). پیام‌رسانی بتا آدرنرژیک چندین فرایند بیولوژیکی را تنظیم می‌کند که مربوط به آغاز و پیشرفت سرطان است(۱۰). گیرنده‌های بتا آدرنرژیک، گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G هستند که به طور عمده عمل انتقال اطلاعات خارج سلولی به داخل سلول را انجام می‌دهند(۱۲). اتصال این نوروترانسمیترها به گیرنده‌های بتا آدرنرژیکی یک آبشار پیام‌رسانی را آغاز می‌کند که سنتز ۳و۵-آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) جفت شده با G پروتئین، فسفریلاسیون پروتئین کیناز A (PKA) و فعال شدن فاکتور رونویسی را القا می‌کند(۱۴ و ۱۳). گزارش شده است که در بسیاری از رده‌های سلولی انسان مانند رده‌های سلولی سرطان مری، سینه، حلق، پانکراس و کولون، بیان گیرنده‌های بتا آدرنرژیکی فاکتور اصلی در تشکیل تومور ناشی از سیگار کشیدن طولانی مدت و استرس مزمن می‌باشد(۱۵). استرس مزمن اغلب سیستم‌های فیزیولوژیکی را به دلیل ارایه طولانی مدت کاتکول‌آمین‌ها و گلوکوکورتیکوئیدها، به طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد(۱۲). نوروترانسمیترهای اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین، آگونیست‌های فیزیولوژیکی برای گیرنده های بتا آدرنرژیک هستند(۱۰). مقادیر بالای کاتکول-آمین‌ها در استرس مزمن برای مدت طولانی، به عنوان یک عامل خطرناک برای سرطان محسوب می‌شود(۱۶). بنابراین بلوکه‌کننده‌های گیرنده‌های بتا آدرنرژیک می‌توانند علیه پیشرفت انواع مختلفی از تومورها نقش مهارکنندگی داشته باشند(۱۰، ۱۳ و ۱۷). هدف این مطالعه بررسی مهار رشد رده‌ی سلول سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) به وسیله داروی ضد استرس پروپرانولول بود.

روش بررسی

برای کشت سلول، سلول‌های سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران(CI22) تهیه شد و پس از شمارش، به تعداد ۱۰ میلیون سلول در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 هپس‌دار(سیگما، آمریکا) در حضور ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (گیبکو، انگلستان) و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پن‌استریپ (پنی‌سیلین + استرپتومایسین) (گیبکو، انگلستان)، در انکوباتور با ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

برای تهیه غلظت‌های مختلف داروی پروپرانولول، پس از انحلال داروی پروپرانولول در DMSO (Dimethyl sulfoxide)، ۲ میکرولیتر از این دارو در ۱

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 حل شد. سپس رقت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار (به ترتیب ۶/۵، ۱۳، ۱۹/۵ و ۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از داروی پروپرانولول تهیه گردید.

با استفاده از روش MTT، خاصیت ضد تکثیری داروی پروپرانولول و غلظت مؤثر آن بررسی شد. بدین ترتیب که پس از سانتریفیوژ و شمارش سلول-های K562 با روش تریپان بلو[1] (مرک، آلمان)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن با تراکم ۲۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف اضافه شد و سپس ۲ میکرولیتر از رقت‌های مختلف داروی پروپرانولول (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) در چهار گروه سه تایی به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک دیگر، تنها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول و سه چاهک دیگر نیز علاوه بر محیط کشت حاوی سلول، حاوی ۲ میکرولیتر DMSO رقیق شده (۲ میکرولیتر DMSO در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت) بودند که این چاهک‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد. این روند در ۳ روز (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تکرار گردید. بعد از تیمار، ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی لیتر بافر PBS (Phosphate buffered saline) (سیگما، آلمان)) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون به منظور حل شدن بلورهای فورمازان حاصل، به چاهک‌ها DMSO اضافه شد و سرانجام شدت نور جذب شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر برای تیمارهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته با استفاده از دستگاه الایزا ریدر ثبت گردید. در نهایت با استفاده از فرمول زیر، درصد سلول‌کشی دارو محاسبه گردید(۱۸):

۱۰۰ × [نور جذب شده کنترل / (نور جذب شده کنترل – نور جذب شده نمونه)] = درصد سلول‌کشی

مقدار IC-50 (Inhibitory concentration-50) (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد از سلول‌ها را از بین می‌برد) دارو نیز تعیین گردید(۱۵۰ میکرومولار).[۱]

بررسی وقوع مرگ سلولی در روش الکتروفورز، ابتدا بافر لیز سلولی شامل ۲۵ میلی‌مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)، ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم(NaCl)، ۱۰ میلی‌مولار تریس بازی(Tris) و سدیم دودسیل سولفات(SDS) ۱ درصد تهیه و pH آن برابر با ۸ تنظیم شده و در نهایت به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس سلول‌ها با غلظت IC50 به دست آمده(۱۵۰ میکرومولار) تیمار شدند. پس از آن سلول-ها در بافر لیزکننده لیز شده و با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. DNA به وسیله فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل با نسبت‌های ۲۵، ۲۴، ۱ استخراج شد. به وسیله ۲ حجم از اتانول ۱۰۰ درصد در ۲۰- درجه سانتی‌گراد در طول شب در فاز آبی، ته-نشین شدند. پلیت‌ها در هوا خشک شده و درون بافر EDTA دار (۱۰ میلی‌مول Tris– HCl، pH= ۷/۸ و ۱ میلی مول EDTA) معلق شدند(۱۹). الکتروفورز افقی DNA، به

1-Trypan Blue

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۷۵ میلی‌ولت در ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE (۹۰ میلی‌مول از Tris، ۹۰ میلی‌مول بوریک اسید و ۲ میلی‌مول از EDTA، pH=۸) انجام شد. DNA بعد از الکتروفورز، به وسیله رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید آشکار گردید(۲۰).

برای بررسی وقوع مرگ سلولی از روش الکتروفوز و روش رنگ‌آمیزی DAPI[۱] استفاده شد سلول‌های K562 با غلظت IC50 از داروی پروپرانولول (۱۵۰ میکرومولار) تیمار شدند. بعد از تیمار سانتریفیوژ شد و روی رسوب سلولی ۲۰۰ــ ۱۰۰ میکرولیتر متانول ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا فیکس شود. پس از آن مجدداً سلول‌ها با ۱۰۰۰ دور در دقیقه(rpm) سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. در این مرحله روی رسوب سلولی ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS به همراه رنگ رقیق شده DAPI (۱ میکرولیتر رنگ DAPI به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر یا بافر PBS) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری شد. پس از انکوباسیون، سلول‌ها با دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS روی رسوب سلولی ریخته شده و سلول‌ها به هم زده شدند تا محلولی یکدست به دست آید. یک قطره از محلول سلولی بر روی لام قرار گرفته و روی آن لامل گذاشته و با میکروسکوپ فلورسانس با فیلتر DAPI مشاهده شد. لازم به ذکر است که این مطالعه‌ی تجربی دارای چندین تیمار بود که هر تیمار ۳ بار تکرار گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار Excel و آزمون آماری تی دانشجویی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

یافته‌های به دست آمده از این مطالعه نشان داد که با روش MTT داروی پروپرانولول در مقایسه با گروه کنترل فعالیت سلول‌کشی دارد. هم‌چنین نتایج نشان داد که فعالیت سلول‌کشی آن کاملاً وابسته به زمان و غلظت دارو می‌باشد. یعنی با افزایش مدت زمان اثر و غلظت دارو، درصد زنده‌مانی سلول‌های K562 کاهش می‌یابد. کاهش زنده‌مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های بالاتر (۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) و زمان ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل کاهش بیشتری نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$). در واقع بیشترین درصد سلول‌کشی در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر و زمان ۷۲ ساعت مشاهده گردید که برابر با ۳۹ درصد کاهش رشد سلولی بود. بیشترین درصد سلول‌کشی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز به ترتیب ۳۰ و ۳۲ درصد بود (نمودار۳ـ۱). غلظت‌ها در تمام مراحل آزمایش تنها با گروه کنترل مقایسه شدند.

تصویر حاصل از الکتروفورز سلول‌های K562 تیمار شده با داروی پروپرانولول بعد از ۷۲ ساعت (که بیشترین اثر مهار رشد در این زمان مشاهده شده بود) و غلظت IC_{50} آن (۱۵۰ میکرومولار) در مقایسه با

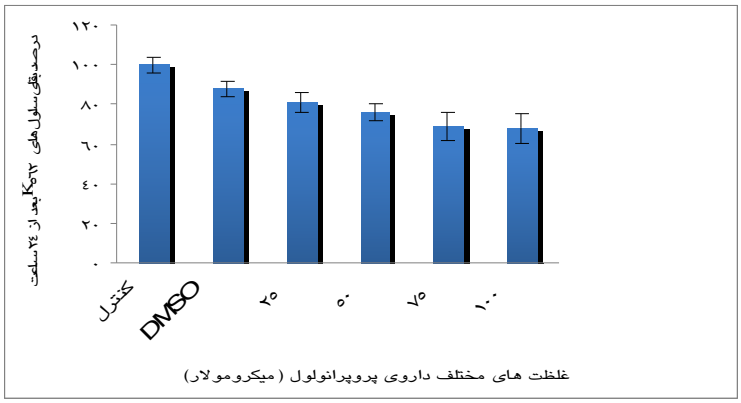
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

چاهک کنترل نشان داد که این دارو ممکن است بتواند سبب القای مرگ سلولی در رده سلول سرطانی K562 شود (تصویر ۱).

پس از انجام مراحل رنگ‌آمیزی DAPI طبق دستورالعمل مربوطه، لام‌های حاوی سلول‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده گردید. نقطه‌های نورانی در شکل، نشان دهنده هسته سلول‌های در حال آپوپتوز می‌باشد. در سلول‌های غیر آپوپتوزی هسته سلول‌ها به صورت گرد است و در سلول‌های آپوپتوزی هسته سلول‌ها به صورت قطعه قطعه مشاهده می‌شود (تصویر ۲). بنابراین داروی پروپرانولول دارای اثر القای مرگ سلولی در رده سلولی K562 است.

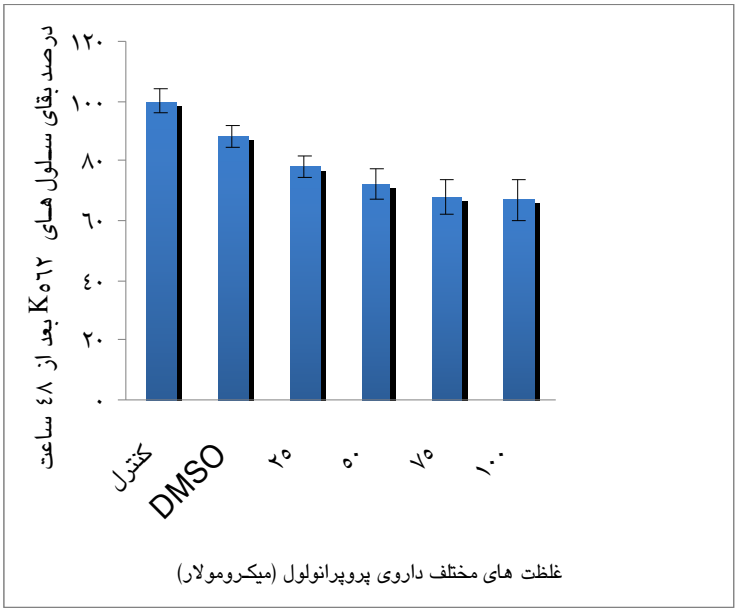
با توجه به نمودار به دست آمده، مشاهده می‌شود که میزان زنده مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کاهش بیشتری در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد. با توجه به نمودار میزان فعالیت سلول کشی پروپرانولول بعد از ۷۲ ساعت، در مقایسه با ۴۸ و ۲۴ ساعت، بیشتر است. به عبارت دیگر فعالیت سلول کشی داروی پروپرانولول در رده سلولی K562 وابسته به غلظت و زمان است ($p<۰/۰۵$)(نمودار ۱و ۲).

با توجه به نمودار به دست آمده، مشاهده می‌شود که میزان زنده مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کاهش بیشتری در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد. باتوجه به نمودار میزان فعالیت سلول کشی پروپرانولول بعد از ۷۲ ساعت، در مقایسه با ۴۸ و ۲۴ ساعت، بیشتر است. به عبارت دیگر فعالیت سلول کشی داروی پروپرانولول در رده سلولی K562 وابسته به غلظت و زمان است($p<۰/۰۵$)(نمودار۳).

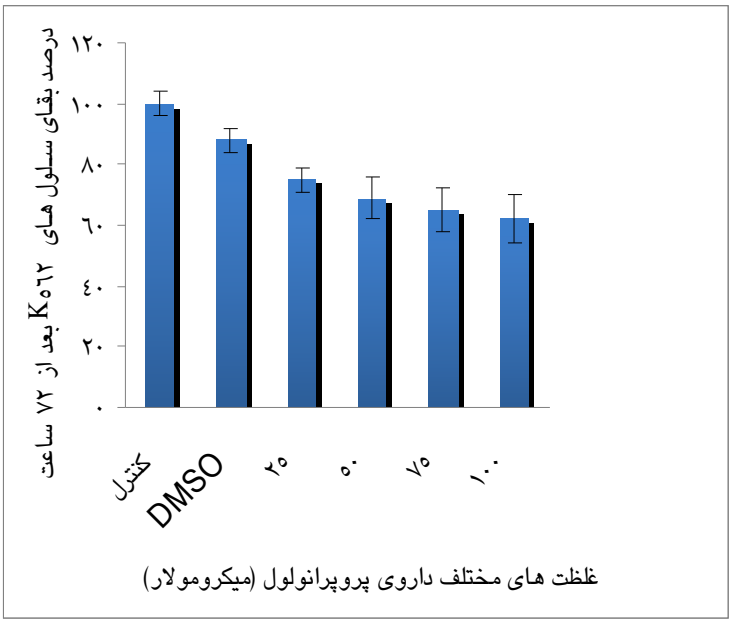


نمودار ۱: درصد زنده‌مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های مختلف داروی پروپرانولول بعد از ۲۴ ساعت تیمار.
در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار پروپرانولول میزان زنده مانی سلول‌های K562 کاهش بیشتری نشان می‌دهد($p<۰/۰۵$).

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

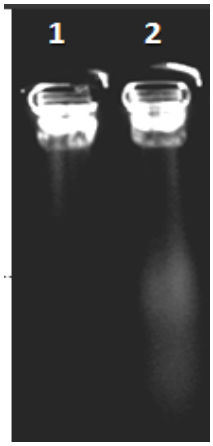


نمودار ۲: درصد زنده‌مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های مختلف داروی پروپرانولول بعد از ۴۸ ساعت تیمار.
با توجه به نمودار به دست آمده، مشاهده می‌شود که میزان زنده مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار کاهش بیشتری در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

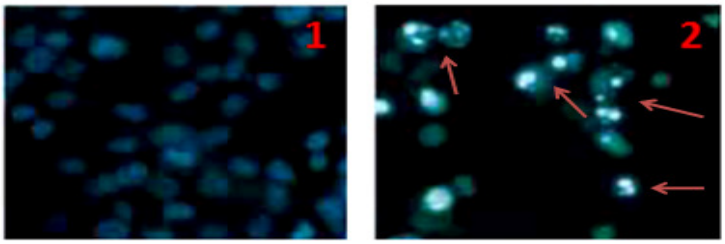


نمودار ۳: درصد زنده‌مانی سلول‌های K562 در غلظت‌های مختلف داروی پروپرانولول بعد از ۷۲ ساعت تیمار.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016



تصویر ۱: چاهک ۱: نمونه کنترل، بدون شکستگی و بنابراین حرکت بسیار کم؛ چاهک ۲: نمونه تیمار شده با داروی پروپرانولول با غلظت IC_{50} (۱۵۰ میکرومولار)، دارای شکستگی و بنابراین حرکت بیشتر.



تصویر۲: بررسی سلول K562 به روش رنگ‌آمیزی DAPI بعد از ۷۲ ساعت با میکروسکوپ فلورسنس برای بررسی وقوع مرگ سلولی.
قسمت ۱ سلول کنترل، قسمت۲ سلول تیمار شده با پروپرانولول با غلظت IC_{50} این دارو (۱۵۰ میکرومولار).

بحث

مطالعه‌ها نشان می‌دهند که استرس مزمن یکی از عوامل تأثیر گذار در ایجاد برخی سرطان‌ها می‌باشد(۱۵). بنابراین بلوکه‌کننده‌های گیرنده‌های بتا آدرنرژیک می‌توانند علیه پیشرفت انواع مختلفی از تومورها نقش مهارکنندگی داشته باشند(۱۷، ۱۰ و۱۳). هدف این مطالعه بررسی اثر داروی پروپرانولول بر روی رشد و تکثیر رده‌ی سلول‌های سرطانی K562 (سرطان سلول‌های میلوئیدی خون انسان) بود.

یافته‌های حاصل از روش MTT و رنگ‌آمیزی DAPI برای بررسی اثر داروی پروپرانولول بر مهار رشد سلول سرطانی K562 نشان داد که این دارو در غلظت‌های خاصی توانست رشد سلول‌های سرطانی را مهار نماید، به طوری که با افزایش غلظت، قدرت سلول‌کشی آن افزایش یافت. هم‌چنین مشاهده شد که تاثیر این دارو بر رشد سلول‌های سرطانی K562 علاوه بر این که وابسته به غلظت است، به زمان نیز وابسته است. بهترین زمان سلول‌کشی داروی پروپرانولول در ۷۲ ساعت پس از تیمار مشاهده شد. میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی به وسیله پروپرانولول در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار پس از ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۵، ۳۱، ۳۵ و ۳۹ درصد بود.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهند داروی پروپرانولول دارای خاصیت ضد سرطانی

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

می‌باشد و می‌تواند سلول‌های سرطانی را به طور معنی‌داری از بین ببرد.

مطالعه‌های زیادی نیز وجود دارند که اهمیت نقش استرس مزمن و تحریک گیرنده‌ی بتا آدرنرژیک را در تهاجم، مهاجرت و رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی کولون (۲۱، ۱۶، ۲۲ و ۱۳)، سینه (۲۳ــ ۲۱، ۱۶، ۱۳، ۱۲ و ۱۰) ، پروستات (۲۱ و ۱۶، ۱۳)، تخمدان (۲۱ و ۱۳ ، ۱۰) و سایر سرطان‌ها نشان می‌دهند(۱۴ و ۱۰). بررسی‌های گسترده نشان می‌دهند که استفاده از آنتاگونیست‌های گیرنده‌های بتا آدرنرژیک، در شرایط درون تن پیش از تشخیص و یا هم‌زمان با شیمی-درمانی و نیز در شرایط برون تن همراه با افزایش بقا و یا کاهش تکثیر، رگ‌زایی، پخش متاستازی و عود تومور در بیماران سرطانی است(۲۷ و ۲۵، ۲۴، ۱۳، ۱۲،۱۰). این یافته‌ها منجر به این فرضیه شده است که بلوکه کننده‌های بتا که به طور رایج تجویز می‌شوند، می‌توانند به طور مطلوبی پیشرفت و متاستاز سرطان را در بیماران تحت تأثیر قرار دهند(۱۷ و۱۳، ۱۰).

برخی از مطالعه‌ها در شرایط برون تن، ویژگی های ضدتکثیری، ضدمهاجرت و سایتوتوکسیکی پروپرانولول را به ویژه علیه آدنوکارسینوماهای ریه، کولون، سینه، نازوفارنژال، سرطان‌های تخمدان، پانکراس و سلول‌های سرطان معده ثابت کرده-اند(۲۷). همچنین نقش پروپرانولول در القای آپوپتوز (۱۵ و ۱۳)، اثرات ضدرگ‌زایی قوی (۲۷ و ۱۰)، از بین بردن ویژگی تهاجمی تومور(۱۲) و در کل مهار رشد تومور (۱۳ و ۱۲) اثبات شده است. مطالعه‌ای نیز نشان داد پروپرانولول فعالیت ضدتکثیری علیه سلول-های Hela و MCF7 دارد(۲).

از آن جا که داروی ذکر شده دارای اثر مهار رشد رده‌ی سرطانی K562 است، ممکن است بتوان از این دارو برای افزایش اثر درمانی داروهای به کار رفته در درمان سرطان و یا توسعه روش‌های نوین درمان سرطان استفاده کرد. این دارو عوارض کمتری دارد، به راحتی قابل دسترس است و از نظر هزینه نیز بسیار مقرون به صرفه می‌باشد.

اهمیت این مطالعه در بررسی اثر مهار رشد و نیز توان القای مرگ سلولی در سلول سرطانی رده K562 (لوسمی میلوئیدی مزمن انسان) بود.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که داروی پروپرانولول موجب مهار تکثیر و القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی رده K562 می‌شود. این خاصیت ضد تکثیری وابسته به غلظت و زمان می‌باشد. علاوه بر این طبق نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که این دارو ممکن است بتواند سبب القای مرگ سلولی در رده سلولی K562 شود. این می‌تواند یک استراتژی بالقوه در مهار رشد سلول‌های سرطان خون باشد و راهکاری برای درمان هدف‌مند سرطان ارایه کند، ولی برای بررسی‌های بیشتر و پی بردن به درصد دقیق میزان آپوپتوز، استفاده از روش‌های کمّی از جمله فلوسایتومتری و انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

REFERENCES

1. Swapnil K, Vijay S, Chandrakant M. Targeted Drug Delivery: A Backbone for Cancer Therapy. Asian Journal of Pharmaceutical Research 2013; 3: 40-6.
2. Sharkawi F, Shemy H, Khaled H. Anticancer activity of some commercial antihypertensive drugs by Neutral Red assay. Life Science Journal 2006; 2013: 10.
3.Torkaman A, Moghadam Charkari N, Aghaei Pour M, Badii K. Leukemia classification based on Cooperative Game Theory and Shapley Value. Modares Journal of Medical Sciences 2010; 13(1): 1-16.
4. Hejazi S, Gholami A, Salarilak S, Khalkhali H R, Moosavi Jahromi L. Incidence rate of acute leukemia in west azarbaijan during 2003-2008. Urmia Medical Journal 2010; 21 (2) :243-8.
5.Bosch GJ, 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: 3522-7.
6.Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96: 3343-56.
7.Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La-Rosee P, Muller MC, Lahaye T, et al. New ELISA technique for analysis of p53 protein/DNA binding properties. Journal of Immunological Methods 2002; 267: 227-35.
8.Apperley JF. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Lancet Oncology 2007; 8(11): 1018-29.
9.Pane F, Intrieri M, Quintarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. Oncogene 2002; 21: 8652-67.
10.Ji TI, Sharp L, Visvanathan K. Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2012; 4(3): 113–25.
11.Black JW, Crowther AF, Shanks RG, Smith LH, Dornhorst AC. A new adrenergic betareceptor antagonist. The Lancet 1964; 283(7342): 1080–1.
12.Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. Cell Cycle 2007; 15; 6(4): 430-3.
13. Pimentel MA, Chai MG, Le CP, Cole SW, Sloan EK. Sympathetic Nervous System Regulation of Metastasis. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
14. Sood AK, Lutgendorf SK. Stress influences on anoikis. Cancer Prev Res 2011; 4(4): 481-5.
15. Liao X, Che X, Zhao W, Zhang D, Bi T, Wang G. The β-adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor κB signaling. Oncol Rep 2010; 24(6): 1669-76.
16. Guo K, Ma Q, Wang L, Hu H, Li J, Zhang D, et al. Norepinephrine- induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. Oncol Rep 2009; 22(4): 825-30.
17. Barron TI, Sharp L, Visvanathan K. Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2012; 4(3): 113– 25.
18. Chin-Feng L, Tzu-Ming P. In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity. Journal of Food and Drug Analysis 2010; 18: 77-86.
19.Maroufi B, KaboudanianArdestani S, Kariminia A, Naderimanesh H. The effect of vitamin E on splenocytes apoptosis of gamma- irradiated BALB/c mice. Iranian journal of allergy. Asthma and Immunology 2005; 4(2): 77- 82.
20.Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. Jun-Yi Leu-Institute of Molecular Biology 1993; 54: 283-8.
21.Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Schuller HM. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. Anticancer Drugs 2009; 20(6): 477-82.
22.Li SH, Sun Y, Gao D. Role of the nervous system in cancer metastasis. Oncol Lett 2013; 5(4): 1101–11.
23.Campbell J, Karolak L, Yun P, Masood-Campbell DS, Penner SK, Munoz NL, Zijlstra SA, et al. Stimulation of host bone marrow stromal cells by sympathetic nerves promotes breast cancer bone metastasis in mice. PLoS Biology 2012; 10:1371.
24.Lương KVQ, Nguyễn LTH. The roles of beta-adrenergic receptors in tumorigenesis and the possible use of beta-adrenergic blockers for cancer treatment: possible genetic and cell-signaling mechanisms. Cancer Management and Research 2012; 4: 431– 45.
25.Nkontchou G, Aout M, Mahmoudi A, Roulot D, Bourcier V, Grando-Lemaire V, et al. Effect of long-term propranolol treatment on hepatocellular carcinoma incidence in patients with HCV-associated cirrhosis. Cancer Prev Res 2012; 5(8): 1007-14.
26.Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino R, Pouchy C, et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. Oncotarget 2011; 2(10): 797-809.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Propranolol on K562 Cell Line

Bastani S, Mohamadzade M*, Pazhang Y

Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 27 Aug 2015 Accepted: 6 Feb 2016

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 9:20 IRST on Wednesday October 19th 2016

Abstract

Background & aim: Beta-adrenergic receptors (β-ARs) are one of the receptors involved in cancer and stress. The therapeutic activity of anti-stress drug of propranolol, which is used to cure the heart disease, such as high blood pressure is attributed to the blockade of β-adrenergic receptors. The aim of this study was to investigate the effect of propranolol on the growth and proliferation of K562 cell line (human chronic myelocytic leukemia).

Methods: In the present experimental study, 10 million K562 cells were cultured in 10 milliliter RPMI 1640 culture media. Then, different concentrations of propranolol 25, 50, 75 and 100 micromolar (6.5, 13, 19 and 26 milligrams per milliliter, respectively) were prepared. K562 cells were examined in six groups of three: as control, treated with DMSO (Dimethyl sulfoxide) and treated with different concentrations of 25, 50, 75 and 100 micromolar of propranolol for the different times of 24, 48 and 72 hours. After treatment of cells with different concentrations of drug, the percentage of inhibitory effect of propranolol on K562 cells viability was estimated by MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at different times (24, 48 and 72 hours). All experiments were repeated at least three times. Moreover, the IC-50 (Inhibitory concentration-50) (the concentration of drug that is required for 50% inhibition) of drug was measured (150 micromolar). Gel electrophoresis of DNA and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining were used for apoptosis investigation. Statistical analysis were performed by using Excel software and student's T-test.

Results: In the present study, propranolol drug decreased the viability of K562 cells and this effect was time- and dose-dependent, therefore, the inhibitory effect of propranolol at 100 micromolar concentration and 72 hours after treatment was the maximum. Using the statistical analysis, it was concluded that this drug may inhibit the growth of K562 cell line ($p<0.05$).

Conclusion: With respect to the results of the present study, propranolol inhibited the growth of K562 cell line and induced cell death in this cell line. These results showed that it may be possible to use this drug in cancer research fields, although more clinical researches are needed.

Keywords: K562 cell line, Beta adrenergic receptor, Propranolol, Cell death

***Corresponding Author: Mohamadzade M,** Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
Email: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:
Bastani S, Mohamadzade M, Pazhang Y. The Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Propranolol on K562 Cell Line. Armaghane-danesh 2016; 20 (12): 1119-1129.