



Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 20, Issue 4 (Autumn 2018), 603-807

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:

Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

القاء اثرات آپوتوتیک و ضدتکثیری در سلول‌های REH متعاقب مهار رسپتور نورکینین-۱ توسط Aprepitant

الهام رازانی (M.Sc)، آوا صفراوغلی آذر (M.Sc)، داود بشاش* (Ph.D)

گروه خون‌شناسی و بانک‌خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱۰

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴ d.bashash@sbmu.ac.ir

چکیده

هدف: به دنبال معرفی مسیر پیام‌رسانی NK1R به عنوان یک مسیر کارسینوژنیک، مطالعات زیادی، فعالیت غیرطبیعی این مسیر را در بسیاری از بدخیمی‌های انسانی گزارش کرده‌اند. بر اساس اهمیت قابل توجه مسیر NK1R در پاتوژنز لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) (ALL)، هدف این مطالعه بررسی تاثیر مهارکننده غیرپپتیدی و رقابتی NK1R (Aprepitant)، بر رده سلولی REH، مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد بود. مواد و روش‌ها: برای بررسی اثر آنتی‌لوسمیک آنتاگونیست NK1R، سلول‌های REH با دوزهای مختلفی از Aprepitant تیمار گشتند و سپس درصد زنده‌مانی، میزان تکثیر سلولی و فعالیت متابولیک آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، به منظور مشخص کردن تاثیر دارو بر پیشرفت چرخه سلولی و القاء آپوتوز، رنگ‌آمیزی Annexin-V/PI و آنالیز محتوای DNA سلولی صورت گرفت. در انتها، میزان تغییر فعالیت رونویسی ژن‌های مرتبط با آپوتوز توسط تست RQ-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها: ما دریافتیم که مهار مسیر پیام‌رسانی NK1R دارای اثرات سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو در رده سلولی REH از طریق افزایش خروج فسفاندیل سرین، افزایش جمعیت سلولی در فاز G1 و کاهش زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با Aprepitant می‌باشد. علاوه بر این، نتایج ما نشان داد که آپوتوز القاء شده توسط Aprepitant در این رده سلولی احتمالاً از طریق تغییر نسبت بیان ژن‌های آنتی‌آپوتوتیک و پروآپوتوتیک، Bcl-2 و Bax، صورت می‌گیرد. نتیجه‌گیری: این مطالعه تاثیر ضد لوسمیک Aprepitant را در رده سلولی Pre-B ALL آشکار کرده و توانایی این دارو را در القاء آپوتوز مشخص می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Aprepitant، آپوتوز، نوروکینین-۱ رسپتور، رده سلولی REH

مقدمه

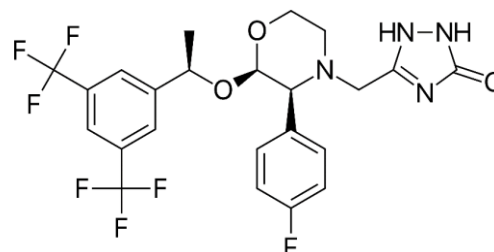
ALL (لوسمی لنفوسیتیک حاد)، تشکیل دهنده ۷۵٪ از کل لوسمی‌ها شایع‌ترین بدخیمی در بین کودکان است. با وجود پیشرفت‌هایی که اخیراً در زمینه درمان ALL صورت گرفته هم‌چنان عود این بیماری در ۲۰٪ از کودکان مبتلا به ALL دیده می‌شود [۱]. هم‌چنین لازم به ذکر است که داروهای شیمی‌درمانی موجب بروز عوارض نامطلوب در مبتلایان به این لوسمی می‌شوند [۱]. وجود چنین مشکلاتی باعث شده است تا تلاش‌های بی‌شماری در جهت بهبود بخشیدن به استراتژی‌های درمانی کنونی صورت گیرد [۲]. بررسی‌های صورت گرفته در زمینه درمان‌های هدفمند، منجر به بهبود درمان‌های فعلی و کاهش عوارض جانبی داروها گشته است. مطالعات صورت گرفته در زمینه ژنتیک و بیولوژی سرطان نقش قابل توجهی را برای مسیر پیام‌رسانی نوروکینین ۱ رسپتور (NK1R) و لیگاند

آن (Substance P) (SP) در رشد، تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی آشکار ساخته است. در پژوهش‌های قبلی عنوان شده است میزان بیان NK1R بر سطح سلول‌های توموری چندین برابر سلول‌های عادی است [۳]. هم‌چنین شواهدی مبنی بر دخیل بودن NK1R در پاتوژنز بسیاری از انواع سرطان مانند سرطان پانکراس [۴]، گلیوبلاستوما [۵]، رتینوبلاستوما [۶]، کلون کارسینوما و لوسمی‌ها وجود دارد [۷]. هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که در بلاست‌های بدخیم لوسمی لنفوبلاستیک حاد، NK1R و ماده P به شدت افزایش بیان دارند [۸]. افزایش بیان NK1R و لیگاند آن در سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های نرمال و هم‌چنین نقش غیر قابل انکار این مسیر پیام‌رسانی در تکثیر و بقای سلول‌های توموری، از طریق فعال‌سازی مولکول‌های پایین دست همچون فسفولیپاز C و

پروتئین کیناز A [۳] مهار این رسپتور را به گزینه‌ای قابل بررسی در زمینه درمان هدفمند سرطان تبدیل کرده است. یکی از مهم‌ترین مهارکنندگان NK1R دارویی با نام Aprepitant می‌باشد که عمدتاً جهت درمان تهوع و استفراغ ناشی از شیمی‌درمانی (CINV) برای بیماران تجویز می‌شود [۹]. در حال حاضر، مطالعات صورت گرفته بر روی این دارو نشان داده‌اند که Aprepitant علاوه بر عوارض جانبی محدود بر روی سلول‌های نرمال [۱۰] دارای اثرات ضد توموری گسترده نیز می‌باشد [۱۱]. بر اساس نقش مسیر NK1R/SP در پاتوژنز لوسمی لنفوبلاستیک حاد [۱۲]، انتظار می‌رود تا مهار این رسپتور بتواند منجر به القاء آپوپتوز و جلوگیری از تکثیر سلول‌های لوسمیک گردد. در این پژوهش سعی شده است تاثیر داروی Aprepitant بر رده سلولی مشتق شده از ALL مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار سلولی. در این مطالعه تجربی، سلول‌های REH (مشتق از لوسمی لنفوسیتیک حاد) (انستیتو پاستور) در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml، پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. تیمار سلول‌های REH با غلظت‌های مختلف Aprepitant (۴۵-۵ میکرومولار) و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت صورت گرفت. داروی Aprepitant (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) (شکل ۱) به صورت پودر لئوفیلیزه در دسترس قرار داشت که از آن استوک ۱ mM از طریق حل کردن پودر در DMSO تهیه گردید. جهت جلوگیری از اثرات حلال بر بقاء سلولی، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه‌گانه انجام شد.



شکل ۱. ساختار شیمیایی داروی aprepitant [۱۳]

آزمون بررسی میزان جذب سلولی تریپان‌بلو. به منظور بررسی تأثیر داروی Aprepitant بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های REH به تعداد $4/5 \times 10^5$ cell/ml در حضور

دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردید. سپس سلول‌های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان‌بلو ۰/۴٪ مخلوط گشته، و پس از انکوباسیون ۱ الی ۲ دقیقه‌ای، شمار سلول‌های زنده توسط لام هماسیتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که سلول‌هایی که رنگ تریپان‌بلو را جذب می‌نمایند جزو سلول‌های زنده و سلول‌هایی که هیچ رنگی را به خود جذب نکرده‌اند زنده محسوب می‌شوند. با استفاده از فرمول زیر میزان زنده‌مانی سلول‌ها را محاسبه می‌شود:

$$\text{میزان زنده‌مانی (\%)} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times (100)$$

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay. برای ارزیابی تأثیر داروی Aprepitant بر فعالیت متابولیک سلول‌های REH، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد دارو اضافه و به مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر به سلول‌های داخل پلیت محلول MTT ۵ mg/ml (سیگما، آمریکا) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه ساینده شده و پس از خالی کردن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری. به منظور بررسی تأثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، 5×10^5 سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف از داروی Aprepitant تیمار گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات-سالیین (PBS) و افزودن معرف‌های AnnexinV-FITC (Roche، آلمان)، PI (Roche، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (PartecPasIII، آلمان) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار Flojo 7.6.1 صورت گرفت.

بررسی میزان فعالیت چرخه سلولی. به منظور شناسایی محتویات DNA سلولی و درصد سلول‌های آپوپتوز شده از رنگ‌آمیزی پروپیدوم یداید (PI) استفاده گردید. سلول‌های REH در پلیت‌های ۵ خانه قرار گرفتند سپس با Aprepitant برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شده و پس از گذشت زمان انکوباسیون، سلول‌ها با دور rpm ۲۰۰۰ برای

SYBR green master mix (Amplicon)، ۲ میکرومولار cDNA، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۷ میکرومولار آب مقطر عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله اتصال/بازآرایی توام (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه) می‌باشد. به منظور بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت؛ هم‌چنین محاسبه نسبی تعداد نسخه‌های mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز آماری. تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $\text{Mean} \pm \text{SD}$ قید شدند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم‌افزار SPSS 21 و GraphPad Prism7 استفاده شد.

زمان ۵ دقیقه سانتی‌فیوژ شدند. در ادامه سلول‌ها در اتانول ۷۰٪ فیکس شده و در دمای 20°C به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس $0.5 \mu\text{g/ml}$ از محلول RNase در PBS افزوده شده و بعد از افزودن PI به مقدار $50 \mu\text{g/ml}$ ، محتویات DNA سلولی به وسیله فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و آنالیز آن از طریق نمودارهای به‌دست آمده صورت پذیرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA. پس از تیمار سلول‌ها با Aprepitant در دوزهای ۵ و ۱۵ میکرومولار و گذشت ۴۸ ساعت، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و هم‌چنین نمونه کنترل با استفاده از تریزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه NanodropND2000 بررسی شد. جهت انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA (TAKARA)، ژاپن استفاده گردید. جهت سنتز cDNA مطابق با بروشور کیت نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه در 85°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

بررسی کمی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 دخیل در آپوپتوز برای بررسی کمی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 آزمون Real Time-PCR انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرومولار

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

ژن	Accession number	آغازگر معکوس (3'-5')	آغازگر مستقیم (5'-3')	اندازه محصول PCR (bp)
HPRT	NM_000194	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	۱۱۱
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bcl-2	NM_000633	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	۲۴۹

افزایش زمان نیز بیش‌تر می‌شود؛ به طوری‌که این دارو در دوز ۴۵ میکرومولار در طول مدت زمان ۴۸ ساعت قادر است بیش‌ترین اثر مهار را بر روی رده سلولی REH اعمال نماید (شکل ۲).

Aprepitant سبب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های REH به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. به منظور بررسی این‌که آیا مهار NK1R در سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌تواند با کاهش زنده‌مانی سلول‌ها همراه باشد، سلول‌های REH با دوزهای مختلف داروی Aprepitant تیمار شدند و سپس میزان زنده‌مانی آن‌ها توسط تست Trypan blue exclusion assay مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش دوز دارو و گذشت زمان، میزان جذب رنگ تریپان‌بلو در سلول‌های REH افزایش می‌یابد که در واقع نشانگر کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مواجه با دارو است. نتایج به‌دست آمده مشخص کردند که علی‌رغم این‌که دوز ۵ میکرومولار از

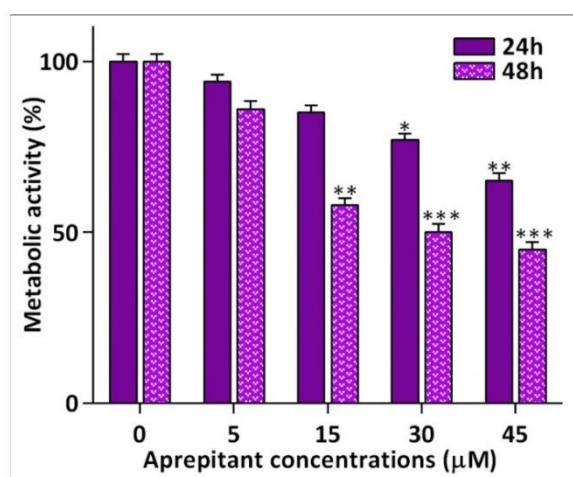
نتایج

تیمار سلول‌های REH با داروی Aprepitant منجر به کاهش میزان تکثیر سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود.

به‌منظور بررسی این‌که آیا داروی Aprepitant می‌تواند از تکثیر سلول‌های REH جلوگیری نماید؛ سلول‌ها با دوزهای افزایشنده از آنتاگونیست NK1R تیمار شدند و سپس تعداد سلول‌های زنده در دو بازه‌ی زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که شمار سلول‌های زنده گروه‌های تیمار شده با داروی Aprepitant در مقایسه با گروه کنترل، به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش یافته است (شکل ۲). با وجود این‌که دوزهای ۵ و ۱۵ میکرومولار از مهارکننده، قادر به اعمال اثر آنتی‌پرولیفراتیوی بر رده سلولی REH در طی ۲۴ ساعت نمی‌باشند، تیمار سلول‌ها با دوزهای بالاتر از این مهارکننده از تکثیر سلول‌ها جلوگیری می‌نماید. روند کاهش شمار سلول‌های زنده با

Aprepitant فعالیت متابولیک سلول‌های REH را

به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. نتایج به دست آمده از آزمون MTT نشان می‌دهند که مهار NK1R توسط داروی Aprepitant، منجر به کاهش وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیکی سلول‌های REH می‌گردد. تیمار سلول‌ها با بالاترین دوز دارو (۴۵ میکرومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان ۴۵٪ کاهش می‌دهد (شکل ۲). به علاوه، این اثر مهار با گذشت زمان بیش‌تر نیز می‌شود؛ به طوری‌که پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با دوز ۴۵ میکرومولار این مهارکننده، فعالیت متابولیک سلول‌های REH به میزان ۵۵٪ کاهش می‌یابد (شکل ۴).

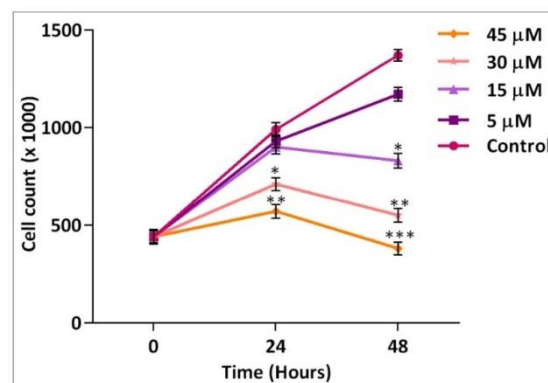


شکل ۴. بررسی تأثیر داروی Aprepitant بر فعالیت متابولیک سلولی REH به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌ها در محیط کامل حاوی دوزهای مختلف داروی Aprepitant برای مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT برای آن‌ها انجام شد. میزان IC₅₀ در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۴۵ میکرومولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (* بیانگر $P < 0.05$ ، ** بیانگر $P < 0.01$ ، *** بیانگر $P < 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

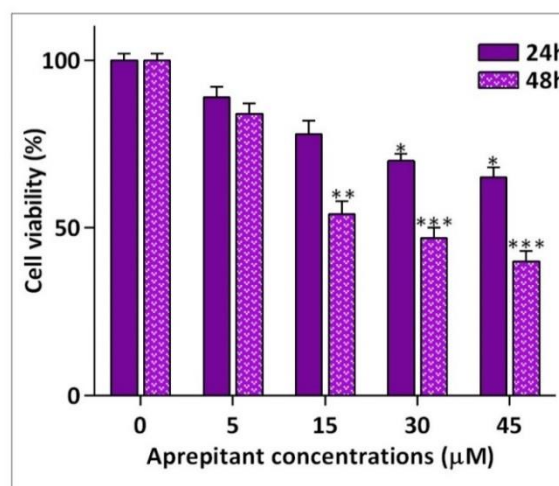
داروی Aprepitant منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های REH می‌شود

برای بررسی آن‌که آیا مهار NK1R در سلول REH با فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی نیز همراه است؛ پس از تیمار ۴۸ ساعته سلول‌ها با دوزهای مختلف Aprepitant، میزان اکسترنالیزه شده فسفاتیدیل سرین با روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که انتظار می‌رفت، نتایج فلوسایتومتری حاکی از آن است که داروی Aprepitant به طور قابل ملاحظه‌ای سبب القاء آپوپتوز در سلول‌های REH می‌شود به طوری‌که در دوز ۴۵ میکرومولار خود قادر است میزان سلول‌های آپوپتوز شده را به میزان ۵۴/۷ برابر نسبت به

Aprepitant اثر چشمگیری بر میزان زنده‌مانی سلول‌های REH نمی‌گذارد؛ تیمار سلول‌ها با دوزهای بالاتر از این مهارکننده (۱۵، ۳۰ و ۴۵ میکرومولار) و در طی ۴۸ ساعت میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به ترتیب به میزان ۶۰، ۵۳ و ۴۶٪ کاهش می‌دهد. به طور کلی این نتیجه بیانگر تأثیر سائتوتوکسیک این دارو به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های رده‌ی REH می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۲. تأثیر دارو Aprepitant بر شمارش سلولی در سلول‌های REH به صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های REH به تعداد 4.5×10^5 با غلظت‌های ۵ تا ۴۵ میکرومولار از Aprepitant تیمار شدند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار با دارو به صورت وابسته به دوز و زمان، شمارش سلولی را کاهش داده است. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (* بیانگر $P < 0.05$ ، ** بیانگر $P < 0.01$ ، *** بیانگر $P < 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۳. تأثیر داروی Aprepitant بر میزان زنده‌مانی سلول‌های REH. سلول‌ها با دوزهای مختلف Aprepitant برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند، سپس میزان زنده‌مانی سلول‌ها بوسیله‌ی آزمون تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (* بیانگر $P < 0.05$ ، ** بیانگر $P < 0.01$ ، *** بیانگر $P < 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

سلول‌های مرحله S چرخه سلولی را نیز به صورت معناداری کاهش دهد که خود تأییدی بر خواص آنتی‌پرولیفراتیوی این مهارکننده در سلول‌های مشتق شده ALL نیز می‌باشد.

افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 به دنبال تیمار رده

سلولی REH با Aprepitant

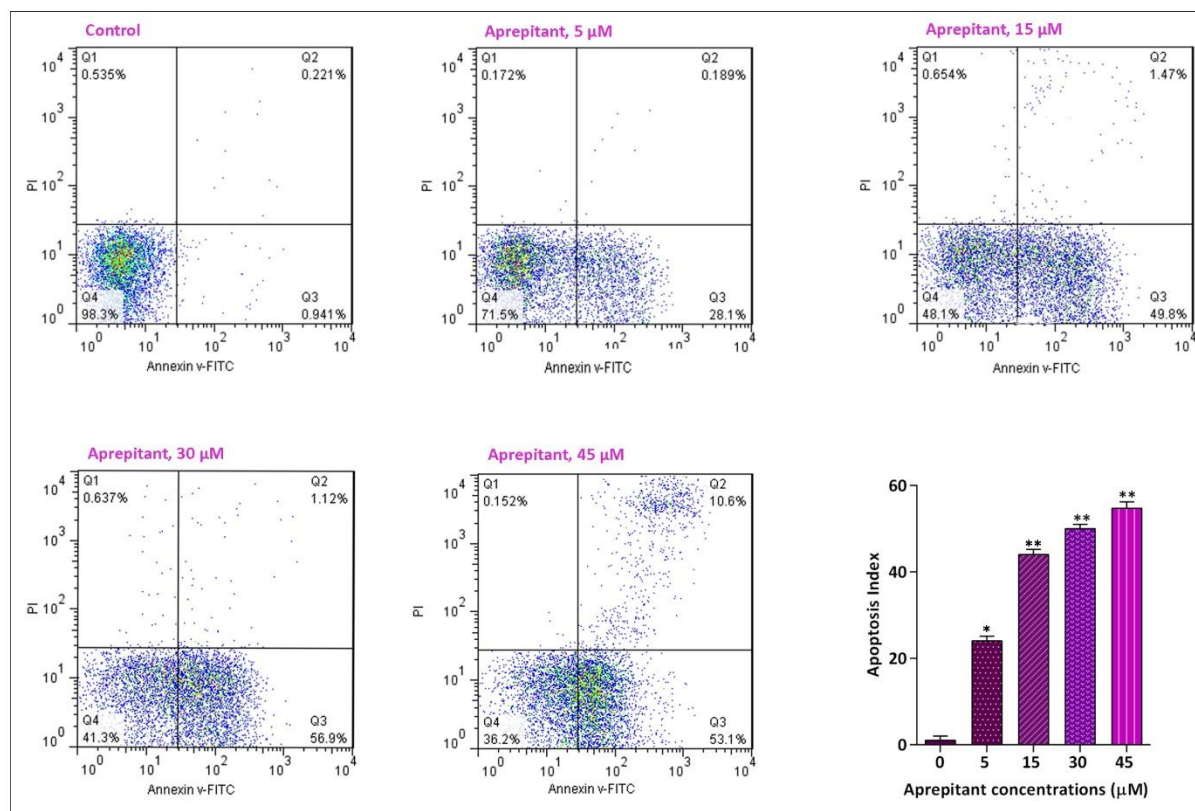
در این مطالعه، به منظور بررسی این‌که آیا مرگ سلولی القاء شده توسط Aprepitant در رده سلولی REH با تغییر در فعالیت رونویسی ژن‌های مهم دخیل در آپوپتوز همراه می‌باشد؛ سطح بیان برخی از ژن آنتی‌آپوپتوتیک (Bcl-2) و پروآپوپتوتیک (Bax) به وسیله تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که تیمار سلول‌های REH با Aprepitant با افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 همراه می‌باشد (شکل ۷). به دلیل افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bcl-2/Bax در سلول‌های مواجه شده با دوز ۱۵ میکرومولار نسبت به سلول‌های کنترل با افزایش همراه بوده که این مسئله نیز با افزایش میزان آپوپتوز خود را نشان داده است (شکل ۷).

گروه کنترل افزایش دهد ($P < 0.01$) (شکل ۵). این نتایج به دست آمده ثابت می‌نماید که داروی Aprepitant با القاء آپوپتوز در سلول‌های REH میزان بقا این سلول‌ها را کاهش داده و بدین‌گونه اثر سایتوتوکسیک خود را اعمال می‌نماید.

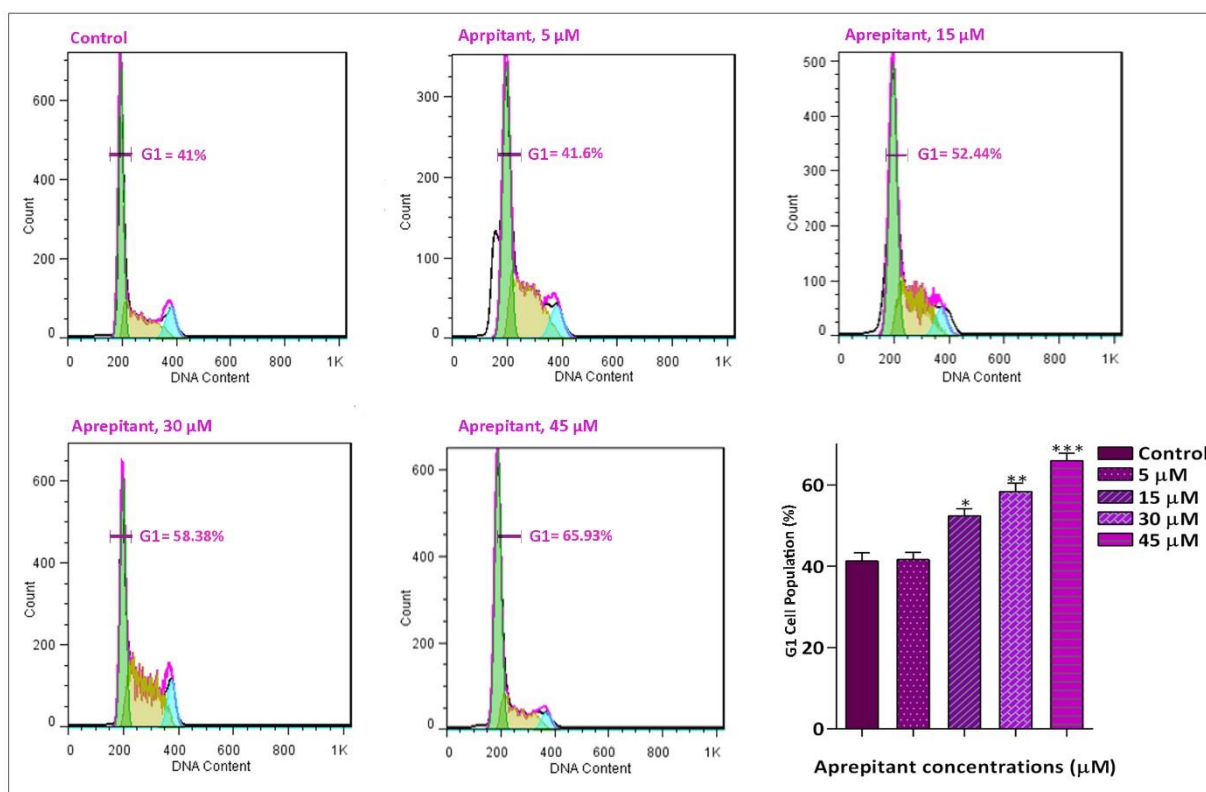
Aprepitant سبب افزایش جمعیت سلول‌های REH در

فاز G1 چرخه سلولی می‌شود

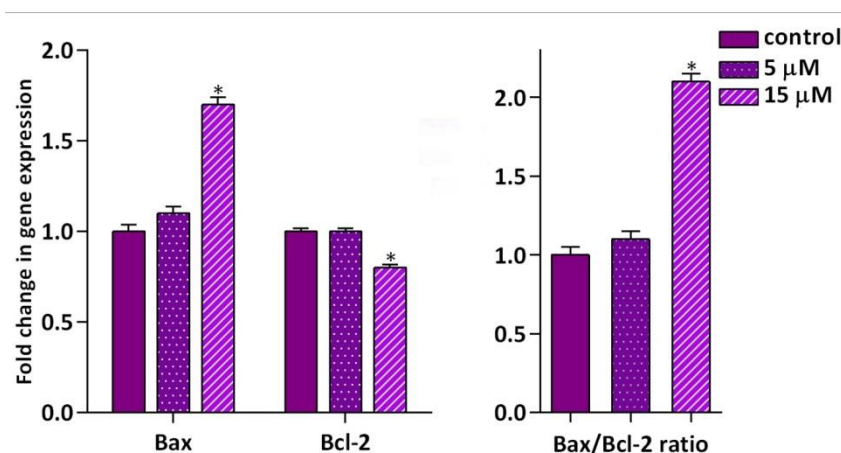
به منظور بررسی این‌که آیا کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های REH متعاقب تیمار با مهارکننده NK1R به علت تغییر در نحوه توزیع سلول‌ها در چرخه سلولی می‌باشد؛ محتوای DNA سلول‌ها پس از تیمار با دوزهای ۴۵-۵ میکرومولار از مهارکننده به مدت ۴۸ ساعت توسط تکنیک فلو سایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمار سلول‌ها با Aprepitant درصد سلول‌های فاز G1 را از ۴۱٪ در گروه کنترل به ۶۵/۹۳٪ در گروه تیمار شده با دوز ۴۵ میکرومولار افزایش می‌دهد و به این ترتیب با القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G1، اثر ضد توموری خود را اعمال می‌نماید (شکل ۶). هم‌چنین لازم به ذکر است که این دارو می‌تواند جمعیت



شکل ۵. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوز شده پس از تیمار با Aprepitant. تیمار سلول‌های REH با این مهارکننده باعث افزایش درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، بیانگر $P < 0.05$ و **، بیانگر $P < 0.01$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۶. تاثیر Aprepitant بر روی نحوه توزیع سلول‌های REH در مراحل مختلف چرخه سلولی: نتایج فلوسایتومتری بررسی نحوه توزیع سلول‌های تیمار شده با مهارکننده در مراحل مختلف چرخه سلولی نشان داد که داروی Aprepitant باعث افزایش سلول‌ها در فاز G1 از چرخه سلولی می‌گردد و همچنین به علت خواص آنتی‌پرولیفراتیوی خود، جمعیت سلول‌ها را نیز در مرحله S کاهش می‌دهد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، **، ***، $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۷. افزایش میزان فعالیت رونویسی از ژن پروآپوپتوتیک Bax و همچنین کاهش سطح mRNA ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 در طی تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های REH با دوز ۱۵ میکرومولار Aprepitant. سلول‌ها با دوز ۵ و ۱۵ میکرومولار Aprepitant برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد نظر تحت آزمون Real-time PCR قرار گرفتند. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه و P value به دست آمده (*، **، ***، $P < 0.05$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات صورت گرفته در زمینه بدخیمی و سرطان آشکار ساخته است که NK1R و مسیر پیام‌رسانی مرتبط با آن از جمله عوامل مهم دخیل در بقا سلول‌های توموری و پیشرفت سرطان می‌باشند [۱۴]. مسیرهای پیام‌رسانی زیردست

NK1R/SP قادر است تکثیر سلولی را افزایش داده و از بروز آپوپتوز ممانعت به عمل بیاورد. افزایش بیان NK1R و همچنین مهم‌ترین لیگاند آن SP در سلول‌های مبتلا به ALL نسبت به سلول‌های نرمال [۷] این گیرنده را به یکی از گزینه‌های قابل توجه در زمینه درمان هدفمند این لوسمی میدل کرده است. با

زمینه به عنوان راه‌کاری نوین در زمینه درمان بدخیمی‌ها بهره برد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تامین بودجه تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- [1] Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 118-125.
- [2] Hinze L, Möricke A, Zimmermann M, Junk S, Cario G, Dagdan E, et al. Prognostic impact of IKZF1 deletions in association with vincristine-dexamethasone pulses during maintenance treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia on trial ALL-BFM 95. *Leukemia* 2017; 31: 1840-1842.
- [3] Esteban F, Munoz M, Gonzalez-Moles M, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 137-145.
- [4] Munoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor is involved in the antitumoral action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on human pancreatic cancer cell lines. *Lett Drug Design Discov* 2006; 3: 323-329.
- [5] Akazawa T, Kwatra SG, Goldsmith LE, Richardson MD, Cox EA, Sampson JH, et al. A constitutively active form of neurokinin 1 receptor and neurokinin 1 receptor-mediated apoptosis in glioblastomas. *J Neurochem* 2009; 109: 1079-1086.
- [6] Munoz M, Rosso M, Pérez A, Covenas R, Rosso R, Zamarrigo C, et al. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 2567-2570.
- [7] Muñoz M, González-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs* 2012; 30: 529-540.
- [8] Grassin-Delye S, Buenestado A, Vallat L, Naline E, Marx S, Decocq J, et al. Expression and proliferative effect of hemokinin-1 in human B-cells. *Peptides* 2011; 32: 1027-1034.
- [9] Quartara L, Altamura M, Evangelista S, Maggi CA. Tachykinin receptor antagonists in clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18: 1843-1864.
- [10] Aapro M, Carides A, Rapoport BL, Schmoll H-J, Zhang L, Warr D. Aprepitant and fosaprepitant: a 10-year review of efficacy and safety. *Oncologist* 2015; 20: 450-458.
- [11] Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs* 2010; 28: 187-193.
- [12] Muñoz M, González-Ortega A, Salinas-Martín MV, Carranza A, García-Rocio S, Almendro V, et al. The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *Int J Oncol* 2014; 45: 1658-1672.
- [13] Nakade S, Ohno T, Kitagawa J, Hashimoto Y, Katayama M, Awata H, et al. Population pharmacokinetics of aprepitant and dexamethasone in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 63: 75-83.
- [14] Kast RE, Ramiro S, Lladó S, Toro S, Coveñas R, Muñoz M. Antitumor action of temozolomide, ritonavir and aprepitant against human glioma cells. *J Neurooncol* 2016; 126: 425-431.
- [15] Garnier A, Imer M, Kappler R, Berger M. Therapeutic Innovations for Targeting Hepatoblastoma. *Anticancer Res* 2016; 36: 5577-5592.
- [16] Garnier A, Vykoukal J, Hubertus J, Alt E, Von Schweinitz D, Kappler R, et al. Targeting the neurokinin-1 receptor inhibits growth of human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2015; 47: 151-160.

وجود این‌که اثر ضد سرطانی Aprepitant، در بسیاری از تومورهای توپیر همچون گلیوما [۱۴]، هیپاتوبلاستوما [۱۵]، سرطان سینه [۱۲]، سرطان روده بزرگ [۱۶]، سرطان معده [۱۷]، استئوسارکوما [۱۸] و برخی از بدخیمی‌های هماتولوژیک [۲۰، ۱۹] نشان داده شده است، تاکنون گزارشی مبنی بر اثرگذاری این مهارکننده NK1R بر روی سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد، REH در دست نمی‌باشد. همین امر باعث گشت این مطالعه روی سلول‌های REH (مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد) صورت گیرد. هم‌چنان که مطالعات صورت گرفته در مورد سرطان ریه نشان داد که مهار NK1R می‌تواند موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شود [۳]، نتایج حاصل از این مطالعه نیز حاکی از آن است که تیمار سلول‌های REH، با مهارکننده انتخابی NK1R، Aprepitant، منجر به کاهش زنده‌مانی، میزان تکثیر و هم‌چنین فعالیت متابولیک سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود؛ به طوری که مجاورت سلول‌ها با دوز ۴۵ میکرومولار دارو منجر به کاهش بیش از ۵۰٪ فعالیت متابولیک سلولی با گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار گردید.

تکثیر خود به خودی و عدم وقوع آپوپتوز یکی از عواملی است که نه تنها به عنوان علت بروز و پیشرفت سرطان شناخته شده بلکه آن را از عوامل دخیل در مقاومت دارویی نیز در این دسته از بیماران دانسته‌اند [۲۱]. با توجه به مرتبط بودن NK1R/SP در پیشبرد مراحل تکثیر، چرخه سلولی و آپوپتوز انتظار می‌رود مهار آن موجب تغییراتی در این فرایندها شود. داروی Aprepitant توانست با مهار فعالیت متابولیک سلول‌ها و نگه‌داشتن آن‌ها در مرحله Sub-G1 چرخه سلولی، موجب فعال شدن مکانیسم‌های آپوپتوز در این رده سلولی گردد. علاوه بر این، بررسی‌های صورت گرفته در زمینه آپوپتوز در این مطالعه در رابطه با ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک نشان داد که این دارو قادر است با افزایش میزان فعالیت رونویسی از ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک مانند Bcl-2 و Bax موجب بر هم خوردن توازن پروتئین‌های دخیل در پروسه آپوپتوز شده و بدین صورت اثر سائیتوتوکسیک خود را اعمال نماید. مقایسه نتایج حاصل از تیمار داروها با دوز ۵ میکرومولار و دوز ۱۵ میکرومولار نشان داد Aprepitant می‌تواند به شکل وابسته به دوز موجب افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک هم‌چون Bax و کاهش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک مانند Bcl-2 گردد.

نتایج حاصله از این پژوهش نقش آنتی‌توموری Aprepitant علیه سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد را نشان داد. امید می‌رود با بررسی و مطالعه بیش‌تر در این

arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 2016; 791: 274-283.

[20] Bayati S, Razani E, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Safa M, Ghaffari SH. Antileukemic effects of neurokinin-1 receptor inhibition on hematologic malignant cells: a novel therapeutic potential for aprepitant. *Anticancer Drugs* 2018; 29: 243-252.

[21] Kryvenko ON, Williamson SR, Trpkov K, Gupta NS, Athanazio D, Selig MK, et al. Small cell-like glandular proliferation of prostate: a rare lesion not related to small cell prostate cancer. *Virchows Arch* 2017; 470: 47-54.

[17] Muñoz M, Coveñas R. Neurokinin-1 receptor antagonists as antitumor drugs in gastrointestinal cancer: A new approach. *Saudi J Gastroenterol* 2016; 22: 260-268.

[18] Muñoz M, Berger M, Rosso M, Gonzalez-Ortega A, Carranza A, Coveñas R. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *Int J Oncol* 2014; 44: 137-146.

[19] Bayati S, Bashash D, Ahmadian S, Safaroghli-Azar A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, et al. Inhibition of tachykinin NK 1 receptor using aprepitant induces apoptotic cell death and G1

Induction of apoptotic and anti-proliferative effects in REH cells upon neurokinin-1 receptor inhibition using Aprepitant

Elham Razani (M.Sc), Ava Safaroghli-Azar (M.Sc), Davood Bashash (Ph.D)*

Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 2122717504 d.bashash@sbmu.ac.ir

Received: 8 Nov 2017; Accepted: 30 Apr 2018

Introduction: Following the first description of neurokinin-1 receptor (NK1R) network as a carcinogenic pathway, overwhelming numbers of studies have reported the inappropriate activity of this cascade in a wide assortment of human cancers. On the basis of the principal importance of NK1R in the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL), it was of great interest to dissect the effect of Aprepitant, a competing non-peptide NK1R antagonist, on REH Pre-B ALL cells.

Materials and Methods: To evaluate the anti-leukemic effect of NK1R antagonist, REH cells were exposed to the increasing concentrations of Aprepitant and subsequent cell viability, growth kinetics, and metabolic activity were investigated. Moreover, to underscore whether Aprepitant-induced cytotoxic effect could be attributed to either induction of apoptosis or cell cycle arrest, Annexin-V/PI staining and DNA content analysis were performed. Finally, the transcriptional alterations of apoptosis-related target genes were studied using RQ-PCR.

Results: Interestingly, we found that abrogation of the NK1R signaling pathway exerts cytotoxic and anti-proliferative effects against REH cells, as evidenced by the increased externalization of phosphatidyl serine (PS), elevated G1 cell population, and decreased number of inhibitor-treated viable cells. In addition, our results also suggested that Aprepitant-induced apoptotic cell death in REH cells is mediated, at least partially, through shifting the ratio of death promoters to death repressors via alteration of Bax and Bcl2 expression.

Conclusion: This study highlighted the potent efficacy of Aprepitant in Pre-B ALL cells and shed light on pro-apoptotic property of this inhibitor.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, Aprepitant, Apoptotic Cell Death, Neurokinin-1 Receptor, REH Cells.