

اثر ضد تکثیری و آپوپتوزی داروی لوواستاتین بر رده سلول سرطانی اریترومیلوئیدی K562

سیده مریم واعظی^۱، دکتر مهدی محمدزاده*^۲، دکتر یعقوب پاژنگ^۲

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لوواستاتین مهارکننده آنزیم هیدروکسی متیل گلوکاریل کوآ ردوکتاز است و برای درمان هیپرکلسترولمی کاربرد دارد. مهار این آنزیم منجر به مهار فعالیت پروتئوکوژن Ras که در اغلب سرطان‌ها دارای موتاسیون است؛ می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی لوواستاتین بر رشد و آپوپتوز رده سلول سرطانی اریترومیلوئیدی K562 انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ابتدا سلول‌های K562 کشت داده شد. سپس سلول‌ها با استفاده از غلظت‌های مختلف لوواستاتین مورد تیمار قرار گرفت. اثر ضد توموری دارو بر رده سلول سرطانی اریترومیلوئیدی K562 بعد از ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT در سه تکرار ارزیابی گردید. برای مطالعه آپوپتوز از الکتروفورز DNA و رنگ‌آمیزی Hoechst (33342) استفاده شد.

یافته‌ها: لوواستاتین دارای خاصیت ضد توموری علیه سلول‌های K562 بود و این اثر با افزایش غلظت و زمان رابطه خطی داشت. بیشترین اثر مهاري دارو در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و ۷۲ ساعت بعد از تیمار برابر با ۵۹ درصد تعیین شد. کاهش رشد سلولی بعد از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۲۴ درصد و ۴۳ درصد تعیین گردید. این دارو به‌طور معنی داری سبب مهار رشد رده K562 گردید ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که لوواستاتین دارای اثر ضد توموری معنی داری بر رده سلول سرطانی اریترومیلوئیدی K562 است.

کلید واژه‌ها: رده سلولی K562، لوواستاتین، رنگ‌آمیزی Hoechst 33342، الکتروفورز DNA

* نویسنده مسؤول: دکتر مهدی محمدزاده، پست الکترونیکی m.mohamadzade@urmia.ac.ir

نشانی: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی: ۵۷۵۷۱۵۱۸۱۸، تلفن ۰۴۴-۳۲۷۷۶۷۰۷، نمابر ۳۲۷۵۳۱۷۲

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۴/۹، اصلاح نهایی: ۱۳۹۵/۱۱/۱۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۱

مقدمه

سلول‌های لنفاوی یا لنفوسیت‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این بافت جزء اصلی سیستم ایمنی بدن است و در قسمت‌های مختلف بدن از جمله عقده‌های لنفاوی، طحال و لوزه‌ها یافت می‌شود. در لوسمی میلوئیدی سلول‌های مغز استخوان درگیر می‌شود. همچنین هر دو لوسمی به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند. بر این اساس چهار نوع لوسمی شامل لوسمی میلوئید حاد (AML)، لوسمی میلوئید مزمن (CML)، لوسمی لنفوسیتیک حاد (ALL) و لوسمی لنفوسیتیک مزمن (CLL) وجود دارد (۳).

لوسمی میلوئید مزمن از دسته بیماری‌های مزمن میلوئیدراتیو است که به دلیل موتاسیون اختصاصی در سلول‌های بنیادی چند توانی مغز استخوان ایجاد می‌گردد. شیوع این بیماری در جهان ۲ تا ۳ نفر در هر صد هزار نفر سالیانه گزارش شده است. احتمالاً CML یکی از گسترده‌ترین بدخیمی‌های انسانی مورد مطالعه است. کشف کروموزوم فیلادلفیا (ph) در سال ۱۹۶۰ به عنوان اولین اختلال کروموزومی مرتبط با نوع خاصی از لوسمی، یک موفقیت بزرگ در بیولوژی سرطان بود. در سال ۱۹۷۳ راولی وجود کروموزوم

سرطان دومین علت مرگ و میر در دنیا و سومین علت در ایران است. سالانه ۵۰۰۰۰ نفر در ایران به این بیماری مبتلا می‌شوند (۱). این بیماری در صورت عدم درمان کشنده است. سرطان خون یا لوسمی یکی از شناخته شده‌ترین انواع سرطان‌ها محسوب می‌شود (۲). لوسمی بیماری پیش رونده و بدخیم بافت‌های خونساز بدن است. این بیماری در اثر تکثیر و تکامل ناقص گلبول‌های سفید خون و پیش‌سازهای 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 گلبول‌های سفید خون متوقف شده و توانایی فرد در مقابله با بیماری‌ها از بین می‌رود. همچنین سلول‌های خونی تولید شده در مغز استخوان (از جمله پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز) را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بر اساس نوع گلبول سفید خون که دچار تراخی‌تگی و سرطان می‌شود؛ لوسمی به دو دسته لنفوییدی (لنفوبلاستی) و میلوئیدی (مغز استخوانی) تقسیم می‌شود. در لوسمی لنفوییدی

انتقال پیام‌های سلولی مهم در رونویسی ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های حیاتی سلول از جمله تکثیر و تمایز و آپوپتوز نقش دارند. استاتین‌ها به واسطه تغییر عملکرد این پروتئین‌ها آثار مهمی بر سلول دارند (۱۳). رده سلولی K562 به عنوان مدل آزمایشگاهی فاز حاد CML انسانی در نظر گرفته می‌شود (۱۴). این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی لوواستاتین بر رشد و آپوپتوز رده سلول‌های سرطانی اریترومیلوئیدی K562 انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی - تحلیلی در آزمایشگاه کشت سلول (شرایط آزمایشگاهی) گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ انجام شد.

تهیه سلول‌های سرطانی و کشت آنها: رده سرطانی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (CI22) تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پن‌استریپ (پنی‌سیلین + استرپتومایسین) (Gibco, England) در انکوباتور (Memert, Germany) با ۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (۱۵). مورفولوژی سلول‌ها در طول مدت کشت مرتباً به وسیله میکروسکوپ فاز معکوس بررسی شدند.

تهیه غلظت‌های مختلف از داروی لوواستاتین: برای تهیه رقت‌های مختلف داروی لوواستاتین، داروی موردنظر از داروخانه تهیه گردید. در مرحله بعد قرص‌ها در هاون پودر شده و سپس بر اساس وزن ملکولی دارو و غلظت‌های مورد نظر از دارو، مقادیر مورد نظر از آن وزن شده و در یک میلی‌لیتر DMSO (به عنوان حلال لوواستاتین) حل شد. سپس ۲ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده در یک میلی‌لیتر محیط کشت حل گردید.

سنجش خاصیت ضدتوموری و سیتوتوکسیک لوواستاتین با روش MTT assay: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها (با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در محیط کشت کامل RPMI به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاوی) (Gibco, England) به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌صاف اضافه شد. سپس ۲ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف داروی لوواستاتین به چاهک‌ها اضافه گردید. سه چاهک تنها دارای ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول بودند و به سه چاهک دیگر علاوه بر محیط کشت حاوی سلول، DMSO اضافه گردید. در مرحله بعد، پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. این مراحل در سه روز تکرار شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بافر PBS (Phosphate Buffered saline) (Sigma, Germany) به تمامی چاهک‌ها افزوده و میکروپلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO خالص

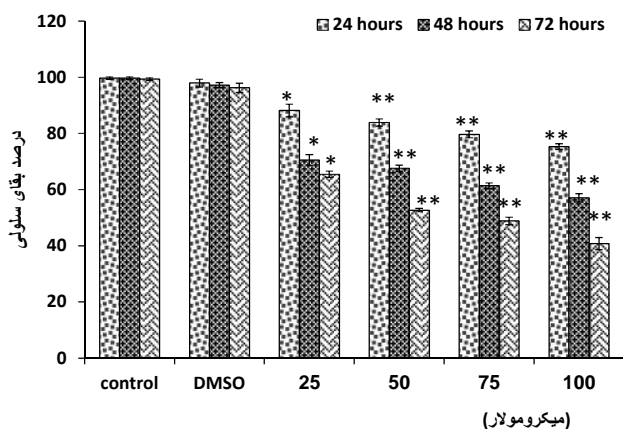
غیرعادی فیلادلفیا را به عنوان یکی از عوامل بروز CML در بیماران شناسایی نمود. در سال ۱۹۸۰ مشخص شد کروموزوم فیلادلفیا حاصل اتصال ژن ABL بر روی کروموزوم ۹ یا بخش BCR بر روی کروموزوم ۲۲ است. نتیجه مولکولی این جابجایی تولید آنکوژن BCR-ABL است که پروتئین کایمیریک BCR-ABL با فعالیت کینازی را کد می‌کند و باعث تکثیر بی‌رویه و اختلال در آپوپتوز می‌گردد (۵و۴). آپوپتوز یک فرآیند برنامه‌ریزی شده مرگ سلولی است که باعث حذف آسیب‌ها یا سلول‌های ناخواسته بدون آسیب در ارگانیسم‌های چندسلولی به منظور کنترل رشد و ثابت نگاه‌داشتن شرایط محیط داخل بدن می‌گردد و از طریق تغییرات ریخت‌شناسی از چروک‌خوردگی سلولی، متراکم شدن کروماتین و تشکیل اجسام آپوپتوتیک مشخص می‌گردد (۶). وقوع جهش در سه گروه از ژن‌ها می‌تواند در وقوع سرطان مؤثر واقع شود که شامل ژن‌های پیش‌سرطان‌زا (پروتوآنکوژن‌ها)، ژن‌های سرکوب‌کننده تومور (TSGs) و ریز RNAها است. پروتوآنکوژن‌ها در فرم جهش‌یافته به آنکوژن‌های سرطانی تبدیل می‌شوند که منجر به تحریک بیش از حد رشد سلولی می‌شوند. ژن‌های سرکوبگر تومور عموماً به عنوان کنترل‌کننده‌های پیشرفت چرخه سلولی عمل می‌کنند و پروتئین‌های محدود کننده چرخه سلولی را تعیین می‌کنند. ریز RNAها بخش عمده‌ای از شبکه تنظیم بیان ژن را تشکیل می‌دهند و با توجه به ایفای نقش متفاوت در تنظیم رشد و چرخه سلولی، می‌توانند نقش مهمی در بروز سرطان داشته باشند (۷و۸). Ras به عنوان یک پروتوآنکوژن و سوئیچ مولکولی در شبکه بزرگ از مسیرهای سیگنالینگ، به طور عمده تمایز و یا تکثیر سلولی را کنترل می‌کند. ژن جهش‌یافته Ras پروتئین‌های فعالی را کد می‌کند که در ایجاد تومور نقش دارند. جهش در Ras در حدود ۳۰ درصد از سرطان‌های انسانی شناسایی شده است (۹). بنابراین مهار عملکرد Ras جهش‌یافته در سلول‌های سرطانی یک استراتژی مهم در درمان سرطان محسوب می‌شود. استاتین‌ها، مهارکنندگان آنزیم HMG-CoA ردوکتاز هستند. اهمیت این داروها عمدتاً به دلیل خاصیت ویژه آنها در پایین آوردن کلسترول خون است (۱۰). این داروها دارای خواص پروآپوپتوزی و مهارکنندگی رشد بر روی سلول‌های نئوپلاستیک با علل گوناگون هستند (۱۱و۱۲). مکانیسم‌های احتمالی در القای آپوپتوز توسط استاتین‌ها به واسطه نقش آنها در مهار آنزیم HMG-CoA ردوکتاز و مهار سنتز مولونات است. مولونات علاوه بر کلسترول پیش‌ساز مولکول‌های ایزوپرنوئیدی از جمله فARNسیل پیروفسفات (FPP) و ژرانیل ژرانیل پیروفسفات (GGPP) است. اتصال این مولکول‌ها به برخی پروتئین‌های سلولی از جمله G پروتئین‌های غشایی و در واقع ایزوپرنیل شدن این پروتئین‌ها برای عملکرد آنها ضروری است. Ras و Rho از شناخته شده‌ترین پروتئین‌های ایزوپرنیل هستند که در

بافر PBS افزوده گردید و کاملاً به هم زده شد تا محتویات یکنواختی حاصل شد. یک قطره از نمونه‌های حاصله روی لام گذاشته شد و روی آن لامل قرار داده شد. لام‌های تهیه شده به زیر میکروسکوپ فلورسانس برده شد و با فیلتر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مشاهده گردید و عکس گرفته شد (۱۸).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاکی از اثر لوواستاتین بر کاهش رشد سلولی در مقایسه با گروه کنترل بود و اثر این دارو بر رشد سلولی با زمان و غلظت رابطه مستقیم داشت. به طوری که با افزایش غلظت دارو و زمان در معرض قرار گرفتن با دارو، اثر بهتری مشاهده گردید. غلظت‌های مختلف لوواستاتین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت، به طور معنی‌داری موجب کاهش رشد سلولی شد ($P < 0/05$). بیشترین اثر در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر و در زمان ۷۲ ساعت مشاهده گردید که برابر با ۵۹ درصد کاهش رشد سلولی بود. درصد سلول‌کشی در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲۴ درصد و ۴۳ درصد تعیین شد (نمودار یک).



نمودار ۱: اثر غلظت‌های مختلف لوواستاتین بر روی سلول‌های K562 بعد از ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت تیمار
 $P < 0/05$ ** $P < 0/001$ *

شکل ظاهری سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی لوواستاتین بعد از ۷۲ ساعت در شکل یک آمده است. به علت تیمار سلول‌های سرطانی با دارو، تغییرات مورفولوژیکی در آنها مشاهده گردید. با افزایش دوز دارو میزان آپوپتوز سلولی افزایش یافت و شکل ظاهری سلول‌ها بهم ریخته شد و میزان رشد سلول نیز کاهش یافت (شکل یک).

با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و رنگ آمیزی هوخست مشخص شد؛ در میان سلول‌های تیمار شده با لوواستاتین پس از گذشت ۷۲ ساعت در مقایسه با سلول‌های کنترل، سلول‌هایی با هسته قطعه‌قطعه شده وجود دارد که نشان‌دهنده مرگ سلولی از نوع

بهاک‌ها افزوده شد و پلیت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در شیکر انکوباتور (Bioteck, South Korea)، قرار داده شد. در نهایت شدت نور جذب شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax, USA) ثبت شد (۱۶). درصد سلول‌کشی داروی مذکور با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد بقای سلولی (Viability) = (جذب چاهک نمونه تقسیم

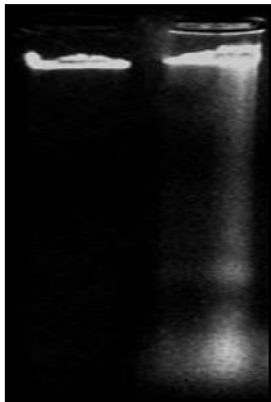
بر جذب چاهک شاهد) $\times 100$

درصد سلول‌کشی = عدد ۱۰۰ نهایی Viability

الکتروفورز DNA: تعداد 2×10^6 سلول در دو فلاسک ریخته شده شد. فلاسک اول با غلظت IC50 لوواستاتین (Inhibitory Concentration-50) که غلظتی از دارو است که ۵۰ درصد سلول‌ها را می‌کشد و توسط نرم‌افزار Compusyn محاسبه گردید؛ تیمار شد. فلاسک دوم بدون تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز (حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار Tris و ۰/۵ درصد SDS، pH=۸) و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتیناز K (Sigma, Germany) به سلول‌ها اضافه گردید و به مدت دو ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. DNA با روش فنل / کلروفورم / ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) استخراج شد. برای رسوب DNA، اتانول خالص و نمک ۶ مولار افزوده شد و بعد از یک شبانه روز نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، محتویات توسط بافر TE (Tris - EDTA) (شامل ۱۰ میلی‌مولار Tris و ۱۰ میلی‌مولار EDTA در pH=۸) (Sigma, Germany) حل شد. DNA آماده شده توسط دستگاه الکتروفورز (Bio Rad, America) با ولتاژ ۸۰ میلی‌ولت به مدت یک ساعت در ژل یک درصد حاوی اتیدیموم بروماید جداسازی شد و ژل مورد تصویربرداری قرار گرفت (۱۷).

رنگ آمیزی سلول‌های K562 با رنگ هوخست: به ۲ خانه از پلیت ۲۴ خانه‌ای، یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۵۰۰ هزار سلول ریخته شد و سپس یک میکرولیتر از غلظت IC50 دارو به یکی از چاهک‌ها ریخته شد و چاهک دیگر بدون تیمار به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، محتویات هر چاهک به میکروتیوب انتقال یافت و در ۲۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محتویات رویی دور ریخته شد و سپس روی رسوب ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر متانول برای فیکس کردن سلول‌ها ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس دوباره سانتریفیوژ شد. روی رسوب سلولی ۵۰ میکرولیتر بافر PBS و ۲ میکرولیتر رنگ Hoechst رقیق شده (یک میکرولیتر Hoechst و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS) افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بار دیگر بعد از سانتریفیوژ کردن روی رسوب ۱۰۰ میکرولیتر

کنترل گردید. DNA سلول‌های K562 تیمار شده با غلظت IC50 لوواستاتین (۶۱ میکرومولار) بر روی ژل الکتروفورز حرکت می‌کنند و موجب ایجاد اسمیر و باند می‌شوند. در حالی که این حالت در سلول‌های کنترل مشاهده نگردید (شکل ۳).



شکل ۳: وضعیت مرگ سلولی سلول‌های K562 تحت تیمار با غلظت IC50 لوواستاتین بعد از ۷۲ ساعت بر روی ژل الکتروفورز چاهک سمت چپ) بدون تیمار؛ چاهک سمت راست) تیمار شده با غلظت IC50 لوواستاتین

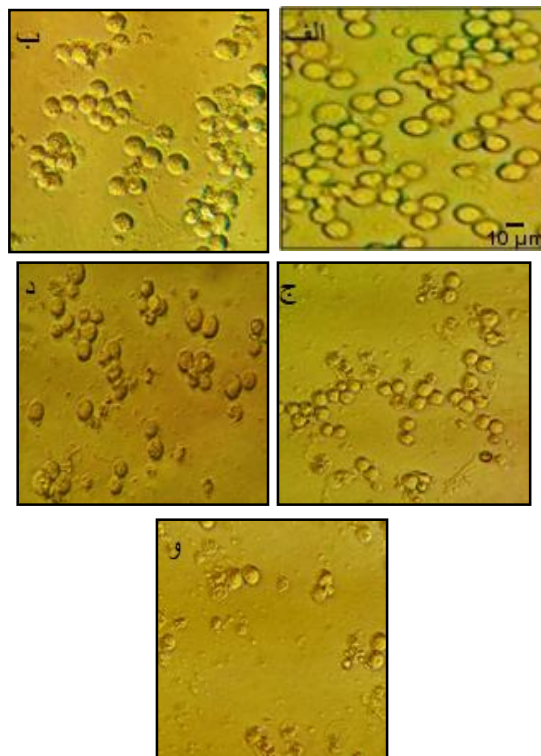
بحث

با توجه به نتایج این مطالعه داروی لوواستاتین سبب مهار رشد و القای آپوپتوز در سلول‌های K562 گردید. به‌طور کلی علاقه به توسعه مهارکننده‌های فارنسیلاسیون به عنوان داروهای ضدسرطان، از ۲۰ سال پیش با فهم این که بعضی از انواع سرطان‌های انسانی دارای فعال‌سازی موتاسیون‌های انکوژنیک در ژن Ras (بین ۹۸-۸ درصد بسته به نوع تومور) هستند؛ افزایش یافت (۱۹). موتاسیون ژن‌های Ras و Rho در انواع سرطان‌ها از جمله لوسمی مزمن یافت شده است (۲۰). استاتین‌ها تولید GPP و FPP را مهار می‌کنند و رشد سلول توموری را در *invivo* و *invitro*، بلوکه می‌کنند. لوواستاتین مهارکننده‌های کینازی چرخه سلولی، p21 و p27 را تثبیت می‌کند و رده سلول سرطان پستان را در فاز G1 چرخه سلولی متوقف می‌کند (۲۰). استاتین‌های طبیعی (لوواستاتین، سیمواستاتین، آتورواستاتین) و استاتین‌های مصنوعی (سرواستاتین) اثر سیتوتوکسیک روی لنفوسیت‌های T و B و میلوماسل دارند که به‌واسطه القای آپوپتوز به دلیل تغییر پروتئین‌های درگیر در تنظیم سیگنال‌های سلولی است (۲۱).

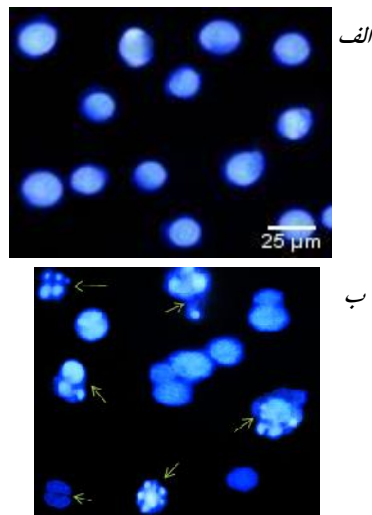
در مطالعه حاضر داروی لوواستاتین توانست رشد سلول‌های سرطانی را به‌طور معنی‌داری هم به صورت وابسته به دوز و هم وابسته به زمان مهار کند. با افزایش غلظت خصوصاً در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر از دارو، قدرت سلول‌کشی آن افزایش یافت و بیشترین اثر پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد.

استاتین‌ها به‌صورت وابسته به دوز می‌توانند موجب پروتئولیز

آپوپتوز است (شکل ۲).



شکل ۱: شکل ظاهری سلول‌های رده K562 پس از ۷۲ ساعت در بزرگ‌نمایی ۴۰×
الف) کنترل (بدون تیمار)؛ ب) غلظت ۲۵ μM دارو؛ ج) غلظت ۵۰ μM دارو؛ د) غلظت ۷۵ μM دارو؛ و) غلظت ۱۰۰ μM دارو در scale bar نشان داده شده روی شکل الف، ضمن منظور شدن بزرگ‌نمایی برای مشاهده شدن، برای تمامی شکل‌ها یکسان در نظر گرفته شد.



شکل ۲: سلول‌های K562 رنگ‌آمیزی شده با Hoechst در میکروسکوپ فلورسانس. الف) سلول‌های بدون تیمار (کنترل)؛ ب) سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 لوواستاتین؛ در scale bar ضمن منظور شدن بزرگ‌نمایی برای مشاهده شدن ۱۰۰×، برای هر دو شکل یکسان در نظر گرفته شده است.

با توجه به نتایج الکتروفورز داروی لوواستاتین باعث تغییر در الگوی ژنومی سلول‌های K562 تیمار شده در مقایسه با سلول‌های

سلول‌های سرطانی تخمدان در یک روش مستقل از p53 و از طریق مهار P-glycoprotein القا نموده و با دو کسوروسین، یک عامل شیمی درمانی مورد استفاده برای درمان عود سرطان تخمدان، اثر سینرژیسمی دارد. همچنین لوواستاتین دارای خاصیت ضدسرطانی بوده و می‌تواند عاملی موثر برای درمان کارسینوما تخمدان باشد (۳۰). استاتین‌ها آپوپتوز را از طریق سرکوب فعال‌سازی Akt و ERK1/2 (۳۱) و فعالیت مجدد JNK که یک کیناز سرکوبگر تومور است؛ القا می‌کنند (۳۲). خاصیت استاتین‌ها در سرکوب تومور ریه مربوط به اثر مهارکنندگی آنها بر روی رسپتور عامل رشد اپیدرمی (EGFR) است. مداوا با لوواستاتین از طریق القاء اتوفسفریلاسیون گیرنده عامل رشد اپیدرمی، باعث مهار عامل رشد اپیدرمی می‌شود. ترکیب لوواستاتین و gefitinib باعث افزایش مهار AKT (پروتئین کیناز مهارکننده آپوپتوز) توسط EGF می‌شود که نتیجه مستقیم این ترکیب افزایش سلول‌کشی در سلول‌های سرطانی ریه است (۳۳).

شواهدی مبنی بر اثرات سرکوب‌کنندگی استاتین‌های مختلف در محیط *in vitro* در مورد مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول‌های آدنوکارسینوما پستان وجود دارد. اغلب استاتین‌ها همچون لوواستاتین دارای اثر سرکوب‌کنندگی علیه تومورهای پستان هستند (۳۲ و ۳۴). در تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط لوواستاتین در سلول‌های توموری کولون (HT29) با روش comet assay، مرگ سلولی از نوع آپوپتوز تشخیص داده شده است (۳۵). در مطالعه حاضر نیز نتایج حاصل از زل الکتروفوروز و رنگ‌آمیزی Hoechst نشان داد که لوواستاتین موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود. از آنجایی که القاء آپوپتوز روش مناسبی برای حذف سلول‌های سرطانی است و اغلب سلول‌های سرطانی دارای نقص در مکانیسم‌های آپوپتوزی خود هستند؛ لذا یافتن ترکیبات القاکننده آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، یکی از اولویت‌های تحقیقاتی محسوب می‌شود (۳۶).

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، ژن‌ها و مسیرهای مولکولی درگیر در مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 شناسایی شود و با بررسی‌های بیشتر در زمینه بنیادی و بالینی، داروی لوواستاتین در کنار سایر داروهای شیمی‌درمانی برای درمان لوسمی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داروی لوواستاتین از خانواده داروهای استاتینی موجب مهار رشد و القاء آپوپتوز در سلول‌های K562 می‌شود که می‌تواند راهی برای درمان هدفمند سرطان ارایه نماید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۶۴-۲۰۰۶)

لامین B (پروتئین غشا اسکلتی هسته) و القای آپوپتوز شوند (۲۲). تحقیقات نشان داده‌اند در بیماران سرطانی تحت شیمی‌درمانی، میزان کلسترول به صورت غیرطبیعی بالا می‌رود. این مسأله به دلیل افزایش بیان mRNA کدکننده رسپتورهای HMG-CoA ردوکناز و LDL است. این افزایش کلسترول منجر به افزایش مقاومت سلول‌ها در برابر عوامل شیمی‌درمانی می‌شود. برای رفع مقاومت ایجادشده پیشنهاد می‌شود استاتین‌ها به همراه سایر داروهای شیمی‌درمانی سرطان استفاده شوند تا از طریق کاهش سطح کلسترول ارزش درمانی را بهبود بخشند (۲۳). در مطالعات مختلف افزایش بیان مولکول‌های پروآپوپتوتیک Bax, Bim و کاهش بیان مولکول‌های مهارکننده آپوپتوز مانند Bcl-2 و فعال شدن کاسپازها در مواجهه با استاتین‌ها مشاهده شده است. لوواستاتین سبب آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پستان از طریق کاهش بیان Bcl-2 شده است (۲۴).

PCNA یک مارکر پرولیفراسیون سلولی و یک نقطه کنترل برای تعمیر DNA است که به‌طور قابل توجهی توسط لوواستاتین در دو رده سلول سرطانی پستان مهار می‌شود. ثابت شده است این مهار با افزایش بیان p21 ارتباط داشته و توقف چرخه سلولی در فاز G1 را به دنبال دارد. همچنین مهار بیان TRAP-1 و Ku70 در سلول‌های سرطان پستان تحت درمان با لوواستاتین دیده شده است. این دو پروتئین سلول‌ها را از آپوپتوز و استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند (۲۵ و ۲۶). از نظر تغییرات متابولیک، مهار آنزیم‌های گلیکولیزی همچون تریوز فسفات ایزومراز، آلفا انولاز و دی هیدرولیپو آمید استیل ترانسفراز و آنزیم‌های چرخه تری کربوکسیلیک اسید همچون SDHA نشان‌دهنده مسیرهای بالقوه‌ای است که می‌تواند مرگ سلولی را از طریق سرکوب مسیر تولید انرژی با استفاده از لوواستاتین القا کند. گلیکولیز مسیر تولید انرژی اولیه در سلول‌های سرطانی است و یک هدف ارزشمند در درمان‌های ضدسرطان است (۲۷).

پروتئین PTEN به عنوان سرکوبگر تومور شناخته شده است و اغلب در طیف گسترده‌ای از سرطان‌ها جهش دارد. توانایی استاتین‌ها برای تحریک بیان بیش از حد PTEN و اهمیت آن برای مصارف درمانی و پیشگیرانه در سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی قبلاً شناخته شده است. القای بیان PTEN توسط لوواستاتین، در لاین سلولی سرطان پستان MDAMB231 مشاهده شده است (۲۷). شواهد مطالعه Barros و همکاران نشان داد آتورواستاتین و پیوگلیتازون به‌صورت سینرژیسمی باعث القای آپوپتوز و مهار پرولیفراسیون در سلول‌های سرطانی پستان و تومورهای جامد می‌شوند (۲۸). به‌علاوه در لاین سلولی سرطان کولون HCT-116 نیز سلکاکسیب همراه با لوواستاتین بیان Caveolin-1 را سرکوب کرده و به قرارگیری غشایی اش آسیب رسانده و مسیر بقای سلولی وابسته به Cav-1 را مهار می‌کند (۲۹). لوواستاتین آپوپتوز را در

پژوهشی دانشگاه که با مساعدت‌ها و حمایت‌های خویش ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند؛ تقدیر و تشکر می‌گردد.

خانم سیده مریم واعظی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی از دانشکده علوم دانشگاه ارومیه بود. بدین وسیله از اساتید و مسؤولین گرامی گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه و معاونت

References

1. Saffar A, Rahgozar M, Shahi F, Biglarian A. [Survival analysis of acute myeloid leukemia]. *Razi J Med Sci*. 2015; 22(134): 41-48. [Article in Persian]
2. Nacken W, Roth J, Sorg C, Kerkhoff C. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc Res Tech*. 2003 Apr; 60(6): 569-80.
3. Mahmoud Abadi A. [Leukemia (Blood cancer)]. 1st ed. Mashhad: Kerdegari Publisher. 2008; pp: 11-55. [Persian]
4. Porwit A, McCullough J. The chronic lymphoid and myeloid leukemia and sustained mastocytosis. In: Porwit A, McCullough J, Erber W. Blood and bone marrow pathology. 2nd ed. London: Churchill Livingstone. 2011; p: 393.
5. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008 Dec; 112(13): 4808-17. doi: 10.1182/blood-2008-07-077958
6. Moosavi MA, Yazdanparast R, Sanati MH. The cytotoxic and anti-proliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and jurkat cells is reduced by guanosine. *J Biochem Mol Biol*. 2005 Jul; 38(4): 391-98.
7. Pasrernak JJ. Molecular Genetics of Cancer Syndromes. An introduction to human molecular genetics. 2nd ed. Ontario Canada: Wiley J & Sons Publications. 2004; pp: 472-73.
8. Noori Dalooi MR, Alvandi E. [Micro RNA: Small but full of mystery and use (review article)]. *Tehran Univ Med J*. 2006 Aug; 64(6): 5-18. [Article in Persian]
9. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jul; 93(14): 1062-74.
10. De Denus S, Spinler SA. Early statin therapy for acute coronary syndromes. *Ann Pharmacother*. 2002 Nov; 36(11): 1749-58.
11. Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2005 Dec; 5(12): 930-42.
12. Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec; 4(12): 977-87.
13. Bellosa S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*. 2000 Apr; 32(3): 164-76.
14. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res*. 1979; 3(6): 363-70.
15. Xu MH, Zhang GY. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. *World J Gastroenterology*. 2005 Mar; 11(11): 1693-96. doi: 10.3748/wjg.v11.i11.1693
16. Nakamura S, Kobayashi M, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, et al. COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells in vitro and growth inhibition of leukemia cells in vivo. *Cancer Therapy*. 2004; 2: 153-66.
17. Bellosillo B, Piqué M, Barragán M, Castaño E, Villamor N, Colomer D, et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1998 Aug; 92(4): 1406-14.
18. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine

- mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Mar; 8(2): 460-64.
19. O'Dwyer PJ, Gallagher M, Nguyen B, Waddell MJ, Chiorean EG. Posters F: Phase 1 and 2 studies. *Annals of Oncology*. 2010; 21 (Supplement 2): ii42-ii44. doi:10.1093/annonc/mdq120
20. Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist*. 2006 Mar; 11(3): 306-15.
21. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis*. 2005 May; 26(5): 883-91.
22. Coogan PF, Smith J, Rosenberg L. Statin use and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(1): 32-40. doi: https://doi.org/10.1093/jnci/djk003
23. Li HY, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE. Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood*. 2003 May; 101(9): 3628-34.
24. Herrero-Martin G, López-Rivas A. Statins activate a mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells by a mechanism regulated by ErbB2 and dependent on the prenylation of proteins. *FEBS Lett*. 2008 Jul; 582(17): 2589-94. doi: 10.1016/j.febslet.2008.06.034
25. Montesano Gesualdi N, Chirico G, Pirozzi G, Costantino E, Landriscina M, Esposito F. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress*. 2007 Nov; 10(4): 342-50.
26. Song JY, Lim JW, Kim H, Morio T, Kim KH. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J Biol Chem*. 2003 Sep; 278(38): 36676-87.
27. Klawitter J, Shokati T, Moll V, Christians U, Klawitter J. Effects of lovastatin on breast cancer cells: a proteo-metabonomic study. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(2): R16. doi: 10.1186/bcr2485
28. Barros AE, Aguiar JS, Araujo LC, Peixoto CA, Medeiros PL, Catanho MT, et al. Synergistic anticancer effects of valproic acid, atorvastatin and pioglitazone in human malignant and murine cells. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013; 8(2): 31-39. doi: 10.5897/AJPP2013.3797
29. Guruswamy S, Rao CV. Synergistic effects of lovastatin and celecoxib on caveolin-1 and its down-stream signaling molecules: Implications for colon cancer prevention. *Int J Oncol*. 2009 Nov; 35(5): 1037-43.
30. Martirosyan A, Clendening JW, Goard CA, Penn LZ. Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance. *BMC Cancer*. 2010 Mar; 10: 103. doi: 10.1186/1471-2407-10-103
31. Yanae M, Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Yamazoe Y, et al. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranylpyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30(1): 74. doi: 10.1186/1756-9966-30-74
32. Koyuturk M, Ersoz M, Altioik N. Simvastatin induces

apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Lett.* 2007 Jun; 250(2): 220-28.

33. Mantha AJ, Hanson JE, Goss G, Lagarde AE, Lorimer IA, Dimitroulakos J. Targeting the mevalonate pathway inhibits the function of the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar; 11(6): 2398-407.

34. Campbell MJ, Esserman LJ, Zhou Y, Shoemaker M, Lobo M, Borman E, et al. Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Res.* 2006 Sep; 66(17): 8707-14.

35. Jafari M, Rezaie M, Kalantari H, Hashemitabar M. Determination of cell death induced by lovastatin on human colon cell line HT29 using comet assay. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2013 Nov; 8(4): 187-91.

36. Jeong SY, Han MH, Jin CY, Kim GY, Choi BT, Nam TJ, et al. Apoptosis induction of human leukemia cells by *Streptomyces* sp. SY-103 metabolites through activation of caspase-3 and inactivation of Akt. *Int J Mol Med.* 2010; 25(1): 31-40.

Original Paper

Anti-proliferative and apoptotic effects of Lovastatin on K562 Erthromyloidy cancer cell line

Vaezi M (M.Sc)¹, Mohammadzadeh M (Ph.D)^{*2}, Pazhang Y (Ph.D)²

¹M.Sc in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

²Assistant Professor, Departemant of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Background and Objective: Lovastatin is a HMG-CoA reductase inhibitor and used for the treatment of hypercholesterolemia. Inhibition of HMG-CoA reductase results in inhibiting the activity of the Ras proto-oncogene that has mutations in most cancers. This study was done to determine the Anti-proliferative and apoptotic effects of Lovastatin on K562 Erthromyloidy cancer cell line.

Methods: The K562 Erthromyloidy cancer cell line were cultured and treated with different concentrations of lovastatin. Their antitumor effect on K562 cells were assessed via MTT assay after 72 hours. Hoechst (33342) staining and DNA electrophoresis were used for study of apoptosis.

Results: Lovastatin had antitumor effect on K562 Erthromyloidy cancer cell line and this effect increased by incese of time and concentration. The maximum inhibitory effect was 59% in higher concentration (100 μ M) and 72 hours after the treatment. Reduced cell growth at 24 and 48 hours after treatment was 24% and 43%, respectively. Lovastatin significantly inhibited K562 cell growth ($P < 0.05$).

Conclusion: This study showed that lovastatin has antitumor effect on K562 Erthromyloidy cancer cell line.

Keywords: K562 Erthromyloidy cancer cell line, Lovastatin, Hoechst staining, DNA electrophoresis

* **Corresponding Author:** Mohammadzadeh M (Ph.D), E-mail: m.mohamadzade@urmia.ac.ir

Received 29 Jun 2016

Revised 29 Jan 2017

Accepted 19 Feb 2017