خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۴ زمستان ۹۴ (۳۳۹-۳۳۱)
مقاله پژوهشی

القای مرگ سلولی و کاهش تکثیر در سلول لوسمی پرومیلوسیتیک حاد NB4 توسط کافئین

مجید صفا[۱]، داود بشاش[۲]، محسن حمیدپور[۳]

چکیده

سابقه و هدف

پیشگیری، درمان و کنترل سرطان با استفاده از مواد طبیعی در حال حاضر به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده در نظر گرفته شده است. در این خصوص، کافئین که یک آلکالوئید پورینی موجود در گیاهان مختلف از جمله قهوه، کاکائو، کولا و چای می‌باشد، به دلیل مهار چند منظوره سرطان از جمله لوسمی‌ها به تازگی توجه زیادی به خود جلب کرده است.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی به منظور بررسی اثر کافئین در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، سلول‌های NB4 در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی مولار کافئین کشت داده شد و متعاقباً از آزمون‌های MTT ، Caspase 3 ، BrdU cell proliferation assay و Quantitative Real-Time PCR جهت بررسی اثر کافئین در القای مرگ سلولی و مطالعه مکانیسم احتمالی آن استفاده شد. آزمون paired student t test و نرم‌افزار SPSS ۱۶ جهت تحلیل داده‌ها به کار رفت.

یافته‌ها

بررسی میزان ساخت DNA و بقای سلولی با استفاده از روش‌های BrdU و MTT ، نشان داد که کافئین میزان تکثیر و بقای سلوهای NB4 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. هم چنین نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که افزایش دوز کافئین موجب القای فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ و افزایش بیان mRNA ژن *Bax* و *p21* می‌گردد.

نتیجه گیری

در مجموع، با توجه به این که مشخص شد کافئین می‌تواند موجب مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد NB4 شود، لذا می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مصرف کافئین به عنوان ماده‌ای در چای ممکن است یک عامل مفید جهت القای مرگ سلولی این سلول‌های بدخیم در مبتلایان به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد عمل کند.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، آپوپتوز، کافئین، کاسپاز

تاریخ دریافت : ۹۳/۵/ ۵
تاریخ پذیرش : ۹۴/۳/۱۹

۱- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران ـ گروه هماتولوژی ـ تهران ـ ایران ـ کد پستی: ۱۴۴۹۶۱۴۵۳۵
۲- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ گروه هماتولوژی ـ میدان قدس ـ خیابان دربند ـ تهران ـ ایران ـ کدپستی: ۱۹۷۱۶۵۳۳۱۲
۳- PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

مقدمه

پیشگیری، درمان و کنترل سرطان با استفاده از مواد طبیعی در حال حاضر به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده در نظر گرفته شده و در مدل‌های تجربی مشخص شده است که بسیاری از مواد طبیعی و یا رژیم غذایی موجب مهار سرطان می‌شوند(۲، ۱). در این خصوص، کافئین به دلیل مهار چند منظوره سرطان در سلول‌های کشت داده شده و یا مدل‌های حیوانی به تازگی توجه زیادی به خود جلب کرده است(۳). کافئین یک ماده شیمیایی و خوردنی است که در گیاهان مختلفی از جمله قهوه، کاکائو، کولا و چای یافت می‌شود. این ماده، یک آلکالوئید از خانواده متیل گزانتین‌ها است و در فرم خالص، به صورت پودر سفید رنگ با مزه تلخ می‌باشد. کافئین که از ترکیب کربن، هیدروژن، نیتروژن و اکسیژن تشکیل شده است، نوعی محرک بوده و می‌تواند از خوابیدن جلوگیری کند. مطالعه‌های انجام شده طی دهه گذشته نشان داده است که کافئین دارای اثرات ضد سرطان بوده و احتمالاً این اثر را از طریق کاهش تکثیر سلولی و یا القای آپوپتوز در سرطان‌ها از جمله لوسمی‌ها اعمال می‌کند(۴).

لوسمی‌ها، گروه ناهمگونی از بدخیمی‌ها هستند که از بدخیم شدن سلول‌های خونساز اولیه در مغز استخوان به وجود می‌آیند. لوسمی، در سال ۱۸۷۰ به عنوان یک بیماری درگیرکننده مغز استخوان عنوان شد و در سال ۱۹۳۰، انواع مورفولوژیک لوسمی‌های حاد و مزمن به خوبی مشخص شدند(۵). لوسمی‌های حاد بر اساس رده سلولی به دو گروه بزرگ لوسمی حاد میلوبلاستیک(AML) و لوسمی حاد لنفوبلاستیک(ALL) تقسیم می‌شوند. لوسمی پرومیلوسیتیک حاد(APL) یکی از زیر گروه‌های AML (AML-M3) می‌باشد. APL حدود ۱۵٪-۱۰٪ انواع AML را به خود اختصاص داده و معمولاً در سنین ۵۰-۴۰ سالگی رخ می‌دهد(۶). این بیماری در اثر نقص در بلوغ گلبول‌های سفید در رده میلوئیدی به وجود می‌آید که طی آن، روند بلوغ در سلول‌های رده گرانولوسیتی در مرحله پرومیلوسیت متوقف می‌شود. به دلیل انعقاد داخل عروقی منتشر(DIC) که ظاهراً ناشی از آزاد شدن مواد پیش انعقادی از گرانول‌های سلول‌های لوسمیک است، مشکلات خونریزی در این بیماری شایع بوده و از جمله علل اصلی مرگ و میر این بیماران محسوب می‌شود(۷). در سال ۱۹۸۵ معرفی ATRA که مشتقی از ویتامین A است، افقی جدید در تاریخچه درمان APL گشود و از میزان مرگ و میر بیماری به طور قابل توجهی کاست. با این حال و علی‌رغم اثر بخشی این کافئین در درمان APL ، درصدی از بیماران دچار عود شده و در نهایت به مرگ بیمار منجر می‌شود(۸).

با توجه به اثرات ضد سرطانی کافئین و از طرفی با در نظر گرفتن عدم موفقیت کامل راه‌کارهای درمانی معمول در APL ، برآن شدیم تا در این تحقیق اثربخشی این آلکالوئید متیل گزانتینی را علیه سلول‌های NB4 (رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) بررسی کنیم. با انجام این تحقیق مشخص شد که کافئین از طریق افزایش بیان ژن‌های *Bax* و *p21* و هم چنین فعال کردن آنزیم کاسپاز ۳ موجب القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد NB4 می‌شود.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (رده سلولی انسانی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد) اولین بار در سال ۱۹۸۹ از مغز استخوان یک خانم جوان ۲۳ ساله مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتیک حاد جداسازی شد. سلول‌های NB4 ، رده سلولی بسیار مناسبی برای مطالعه‌های *in vitro* در مورد لوسمی پرومیلوسیتیک حاد محسوب می‌شود. در این مطالعه، سلول‌های این رده سلولی که از انستیتو پاستور تهیه شده بود، در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۲ mM از L -گلوتامین، ۱۰٪ FBS ، پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ U/mL و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ µg/mL در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ از CO_2 کشت داده شدند.

تیمار با کافئین:

برای تیمار سلول‌ها، از کافئین(آمریکا، سیگما) استفاده شد. محلول ذخیره کافئین به واسطه حل کردن این ماده در آب مقطر استریل تهیه شد. محلول ذخیره را در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

میکروتیوب‌ها تقسیم کرده و آن‌ها را در دمای اتاق تا زمان مصرف نگهداری کردیم. به منظور تعیین اثرات بهینه کافئین، ۲ متغیر دوز و زمان در این تحقیق در نظر گرفته شد. سلول‌های سرطانی با غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار از کافئین تیمار شدند و به ترتیب پس از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. در ضمن به منظور افزایش بهره‌وری کار و بررسی مقایسه‌ای، آزمایش‌ها به صورت دوبار تکرار انجام شد.

Microculture Tetrazolium Test :

میزان حیات سلولی توسط آزمایش MTT بررسی شد. جهت انجام آزمایش بعد از دو بار پاساژ دادن، سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه (۵۰۰۰ سلول در هر خانه) منتقل شدند. هنگامی که MTT زرد رنگ وارد سلول‌های زنده می‌شود، به وسیله آنزیم دهیدروژناز این سلول‌ها احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگ ایجاد می‌کند. به طور خلاصه، بعد از اتمام زمان تیمار سلول‌ها با گلوکز، محلول MTT (mg/mL ۵ در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

پس از طی زمان انکوباسیون، پلیت حاوی سلول‌ها با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی در چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوب‌های بنفش MTT ، تکان داده شد. سپس توسط الایزا ریدر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه اثر توکسیسیتی کافئین بر روی بقای سلول‌های NB4 و بررسی میزان مرگ سلول‌های تیمار شده، از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{میزان مرگ سلول‌ها (٪)} = 1 - \frac{\text{OD exp}}{\text{OD cont}} \times 100$$

در این فرمول، OD exp و OD cont به ترتیب بیانگر جذب نوری سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌باشد.

آزمون BrdU :

اثر مهاری کافئین بر تکثیر سلول‌های NB4 از طریق تعیین میزان مشارکت برمو داکسی یوریدین در DNA سلول‌های NB4 با استفاده از BrdU-based cell proliferation ELISA kit طبق دستورالعمل کیت اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک درون پلیت ۹۶ تایی در حضور یا عدم حضور کافئین کشت داده شدند. ۱۲ ساعت مانده به انتهای زمان انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر محلول BrdU که در کیت موجود می‌باشد، به سلول‌ها افزوده شد. در ادامه و با استفاده از محلول FixDenat ، سلول‌ها فیکس شده و DNA آن‌ها دناتوره گردید. سلول‌ها با آنتی‌بادی علیه BrdU که با آنزیم پراکسیداز کنژوگه می‌باشد، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و در انتهای این زمان، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB افزوده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و آن هم به منظور پایان دادن به عملکرد آنزیم پراکسیداز، از محلول اسید سولفوریک ۱ مولار استفاده شد. در انتها، میزان رنگ ایجاد شده در هر چاهک با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm خوانده شد. برای محاسبه اثر مهاری کافئین بر تکثیر سلول‌های NB4 و بررسی میزان کاهش ساخت DNA سلول‌های تیمار شده، از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{میزان مهار تکثیر (٪)} = 1 - \frac{\text{OD exp}}{\text{OD cont}} \times 100$$

در این فرمول، OD exp و OD cont به ترتیب بیانگر جذب نوری سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده (کنترل) می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ :

برای ارزیابی اثر کافئین در القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 ، روش رنگ‌سنجی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده(سیگما) انجام گرفت. اساس آزمایش، اندازه‌گیری اسپکتروفتومتریک رنگی بود که در اثر آزاد شدن مولکول pNA (متصل به سوبسترا) تحت تاثیر فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ ایجاد می‌شود. پس از تیمار ۴۸

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

جدول ۱: توالی آغازگرها

ژن	آغازگر جلوبرنده ('3→5')	آغازگر معکوس ('3→5')	اندازه(bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
p21	CCTGTCACTGTCTTGTACCCT	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	۱۳۰
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲

ساعته، سلول‌های NB4 را با دور g ۶۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ کرده، رسوب سلولی را لیز نموده و لیزات سلولی را با دور g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم. در حجم نهایی µL ۱۰۰، مقدار ۵ میکروگرم از مایع رویی را با µL ۸۵ بافر آزمایش و µL ۱۰ از سوبسترای کاسپاز ۳ (Ac-DEVD-pNA) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. پس از طی زمان مورد نظر، جذب نوری نمونه‌ها را در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمودیم.

استخراج RNA و ساخت cDNA:

برای استخراج RNA از سلول‌های مورد مطالعه، از محلول TriPure Isolation Reagent (رُوش) طبق دستورالعمل استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های NB4 با کافئین و متعاقب گذشت زمان ۴۸ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج شده و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از(فرمنتاژ) RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ میکرولیتر و محتویات آن شامل µL ۴ بافر ۵ X PCR ، ۲µL از dNTP ، µL ۱ راندم هگزامر، µL ۱ آب تیمار شده با DEPC ، µL ۱ مهار کننده RNase (۲۰ U/µL)، µL ۱ ترانس کریپتاز معکوس M-MULV (۲۰۰ U/µL) و µg ۱ از RNA مورد آزمایش به ازای هر واکنش بود. محتوی مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در نهایت، واکنش ساخت cDNA به واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایان پذیرفت. cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری کمی بیان ژن‌های Bax و p21 با RQ-PCR:

آزمون Real-time PCR در دستگاه Roter Gene 6000 Real Time PCR System (کیاژن) و در حجم ۲۰ میکرو لیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، µL ۱۰ از Maxima SYBR green master mix (فرمنتاز)، µL ۲ از محصول cDNA ، µL ۰/۵ از هر یک از آغازگرها (۲۰ nmol) و µL ۷ آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۵ سیکل برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در۶۰ درجه سانتی‌گراد) بود. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد(جدول ۱).

آنالیز آماری:

برای انجام مطالعه‌های آماری از SPSS ۱۶ استفاده شد. اختلاف آماری بین گروه‌های کنترل و تیمار شده با استفاده از Paired Student's t-test بررسی شد. مقادیر به دست آمده با $p< ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

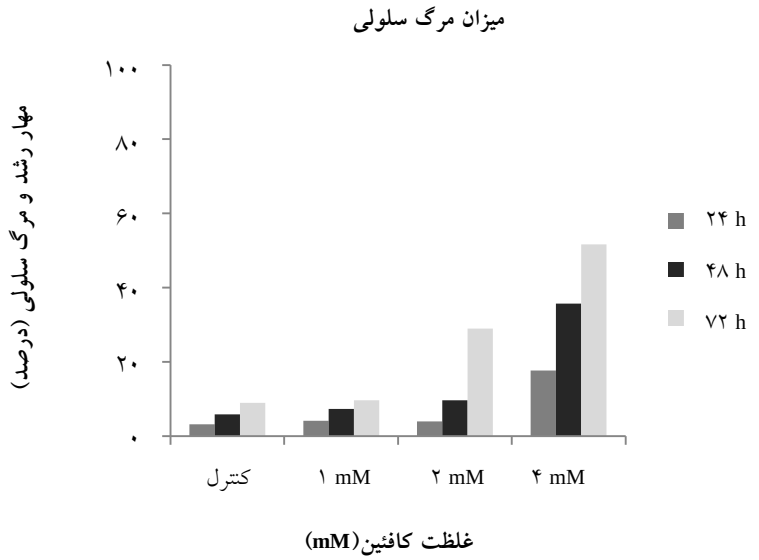
یافته‌ها

بررسی میزان سیتوتوکسیسیتی کافئین بر سلول‌های رده NB4:

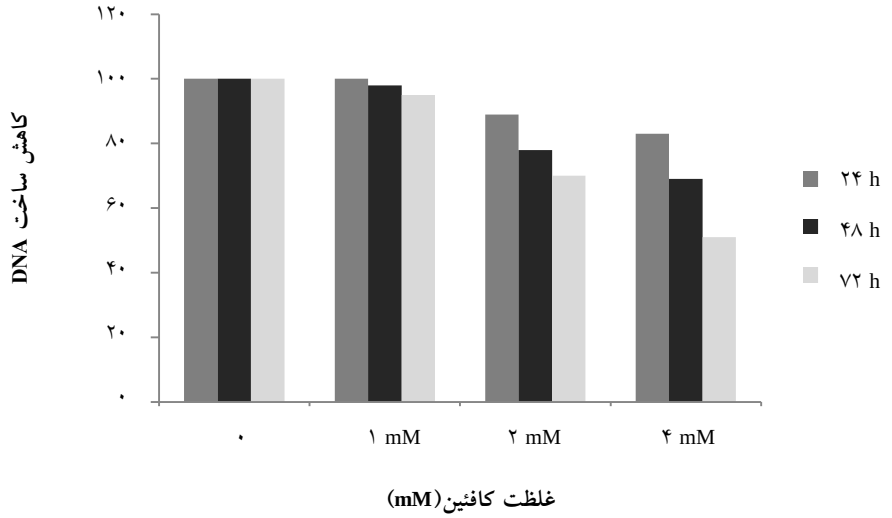
پس از کشت رده سلولی NB4 در حضور غلظت‌های

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

مختلف کافئین، میزان بقای سلولی جهت بررسی تاثیر کافئین به صورت روزانه طی ۳ روز با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از روش MTT نشان داد که کافئین رشد سلوهای NB4 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. همان طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، دوز ۱ میلی‌مولار کافئین تاثیر چندانی بر بقای سلول‌ها ندارد؛ در حالی که کافئین به طور مؤثری موجب عدم رشد و القای مرگ سلول‌های NB4 با ۴ میلی‌مولار IC50 (در ۷۲ ساعت) می‌شود(نمودار ۱).



نمودار۱: القای مهار رشد و مرگ سلولی توسط کافئین در سلول‌های NB4 . سلول‌های NB4 با دوزهای مختلف کافئین برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ تیمار شدند و میزان مرگ سلولی با روش MTT بررسی شد(n= ۳ ، mean ± SD). همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، کافئین هم به طور وابسته به دوز و هم وابسته به زمان سبب القای مهار رشد و مرگ سلولی سلول‌های NB4 می‌شود.



نمودار ۲: کاهش میزان ساخت DNA توسط کافئین در سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 با دوزهای مختلف کافئین برای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ تیمار شدند و میزان ساخت DNA با روش BrdU بررسی شد(n= ۳ ، mean ± SD). همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، کافئین هم به طور وابسته به دوز و هم وابسته به زمان قادر به کاهش میزان ساخت DNA در سلول‌های NB4 می‌باشد.

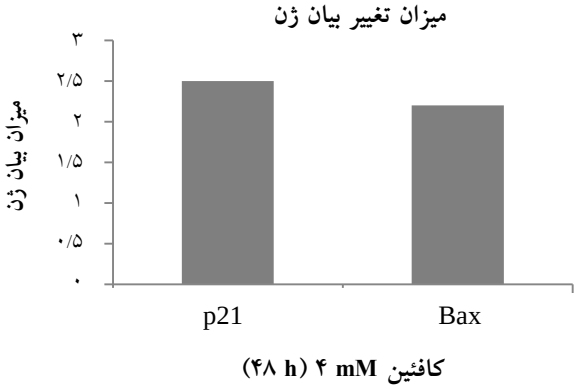
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

کاهش میزان ساخت DNA توسط کافئین در سلول‌های NB4 :

به منظور تعیین اثربخشی کافئین بر روی تکثیر و ساخت DNA در رده سلولی NB4 ، آزمون BrdU انجام شد. طی بررسی‌های وابسته به دوز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشخص گردید که کافئین هم به طور وابسته به دوز و هم وابسته به زمان قادر به مهار تکثیر سلول‌های NB4 می‌باشد. همان گونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، غلظت mM ۱ کافئین هیچ گونه اثری در مهار میزان سنتز DNA سلول‌ها ندارد، در حالی که در غلظت mM ۲، فعالیت تکثیر سلول‌ها در زمان‌های ذکر شده به ترتیب به ۸۹٪ ، ۷۸٪ و ۷۰٪ کاهش یافت. با افزایش غلظت کافئین مشخص شد که کاهش تکثیر و مهار ساخت DNA در غلظت‌های ۴ میلی مولار بیشتر از غلظت ۲ میلی‌مولار بوده است؛ به گونه‌ای که میزان تکثیر سلول‌های NB4 تیمار شده به مدت ۷۲ ساعت با دوزهای ۴ میلی‌مولار به ۵۱٪ کاهش پیدا کرد(نمودار ۲). با توجه به این نتایج می‌توان به این نکته پی برد که هر چه سلول‌ها زمان طولانی‌تری تحت تیمار با کافئین قرار گرفته باشند، میزان رشدشان کمتر می‌شود. هم چنین در دوزهای بالاتر ممانعت از رشد سلولی سریعتر و به میزان بیشتری صورت می‌گیرد.

افزایش بیان ژن‌های Bax و p21 در اثر تیمار سلول‌های NB4 با کافئین:

پروتئین Bax به عنوان یک پروتئین کلیدی در آپوپتوز القا شده توسط عوامل مختلف در مسیر داخلی آپوپتوز عمل می‌کند. این پروتئین از طریق بر همکنش با پروتئین‌های غشای میتوکندری موجب افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن کاسپازها و در نهایت آپوپتوز می‌شود(۹). پروتئین p21 به عنوان یک تنظیم‌کننده چرخه سلولی و دخیل در آپوپتوز مطرح می‌باشد(۱۰). برای بررسی میزان تاثیر کافئین بر بیان ژن‌های *Bax* و *p21* ، میزان بیان mRNA این دو ژن توسط روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، سلول‌ها با دوز ۴ میلی‌مولار کافئین در محیط کشت برای ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس سلول‌ها برداشت شده و RNA سلولی استخراج گردید. همان طور که در نمودار ۳ نشان داده شده است، کافئین به مقدار قابل توجهی میزان بیان mRNA ژن *Bax* و *p21* را افزایش داد.



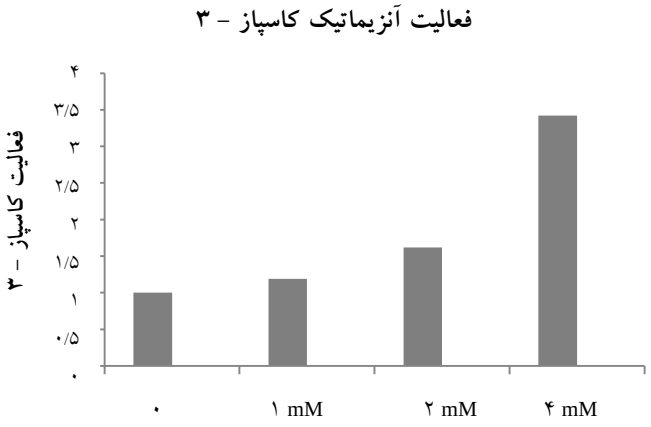
نمودار ۳: تاثیر کافئین بر میزان بیان ژن‌های *Bax* و *p21* . پس از تیمار سلول‌های NB4 با دوز ۴ میلی‌مولار کافئین برای ۴۸ ساعت، RNA از سلول‌ها استخراج گردید و میزان بیان نسبی mRNA هر کدام از ژن‌ها پس از نرمال‌سازی با ژن GAPDH محاسبه شد(n= ۳، mean ± SD). همان طور که در نمودار نشان داده شده است، کافئین به مقدار قابل توجهی میزان بیان mRNA ژن *Bax* و *p21* را افزایش داد.

افزایش فعالیت کاسپاز۳ توسط کافئین در سلول‌های NB4 :

هسته مرکزی تشکیلات تخصصی آپوپتوز، یک سیستم پروتئولیتیک شامل خانواده‌ای از پروتئازها به نام کاسپازها می‌باشد(۱۱). در این میان کاسپاز-۳، کاسپاز مهمی است که نقشی محوری در فاز اجرایی آپوپتوز سلولی دارد(۱۳، ۱۲). جهت بررسی اثر کافئین بر القای آپوپتوز در رده سلولی NB4 از طریق فعالیت آنزیم کاسپاز-۳، فعالیت آنزیماتیک این آنزیم اندازه‌گیری شد. بدین منظور، سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از کافئین به مدت ۷۲ ساعت تیمار شده و میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ با اندازه‌گیری غلظت p-NA آزاد شده اندازه‌گیری شد. طی ۷۲ ساعت از تیمار کافئینی سلول‌ها، کافئین به صورت وابسته به دوز و به ترتیب در دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار موجب القای فعال شدن آنزیم کاسپاز به میزان ۱/۶۲٪ و ۳/۴۲٪ می‌گردد ؛ این در حالی است که دوز ۱ میلی‌مولار هیچ گونه تاثیری در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

القای فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ در سلول‌های NB4 ندارد (نمودار ۴).



نمودار ۴: افزایش فعالیت کاسپاز ۳ توسط کافئین در سلول‌های NB4. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با کافئین تیمار شده و میزان تغییر در فعالیت آنزیم کاسپاز-۳ اندازه‌گیری شد. طی ۷۲ ساعت از تیمار، دوزهای ۲ و ۴ میلی مولار کافئین به ترتیب موجب القای فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ به میزان ۱/۶۲٪ و ۳/۴۲ ٪ می‌گردد.

بحث

کافئین از آلکالوئیدهای پورین بوده و یک جزء کلیدی از نوشیدنی‌های بسیاری از مردم به ویژه چای و قهوه است. این ماده دارای خواص فیزیولوژیکی خاص بوده و به علت اثرات تحریکی آن بر سیستم عصبی و هومورال، به عنوان یک عامل ضد خواب کاملاً شناخته شده است. اخیراً مطالعه‌های انجام شده نشان داده است که کافئین دارای اثرات ضد سرطان می‌باشد؛ با این حال مکانیسم اثرات ضد سرطان این آلکالوئید پورینی به خوبی معرفی نشده است(۴). طی مطالعه‌ای مشخص شده است که کافئین به میزان قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش آپوپتوز و آسیب میتوکندریال در سلول‌های سرطانی رده‌های HL-60 و U937 تیمار شده با PD184352 (مهارکننده پروتئین کیناز فعال شونده توسط میتوژن) می‌شود(۱۴). هم چنین نشان داده شده است که کافئین موجب مهار ATM3 و فعالیت کینازهای ATR شده و از بروز سرطان پیشگیری می‌کند(۱۶، ۱۵، ۴). از جمله سایر مطالعه‌های مرتبط با اثرات ضد سرطان کافئین می‌توان به افزایش حساسیت سلول‌های جنین موش و سلول‌های رده Hella نسبت به اشعه، مهار سرطان پوست ناشی از پرتوی UVB در موش‌ها و افزایش حساسیت سلول‌ها به برخی از عوامل شیمی درمانی اشاره کرد(۱۹-۱۷، ۴). در این مطالعه و با بررسی میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT مشخص شد که کافئین رشد سلوهای NB4 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. هم چنین، طی بررسی‌های وابسته به دوز در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مشخص گردید که کافئین هم به طور وابسته به دوز و هم وابسته به زمان قادر به مهار تکثیر سلول‌های NB4 می‌باشد. با این که مکانیسم اثرات ضد سرطان کافئین به خوبی مشخص نیست، اما می‌توان به اثرات این ماده بر تکثیر سلولی، آپوپتوز، آنژیوژنز و یا سیستم ایمنی اشاره داشت (۴). در این خصوص، گزارش‌ها نشان می‌دهد که غلظت بالای کافئین به طور مستقیم موجب القای آپوپتوز سلولی می‌گردد(۲۲-۲۰). ژن *Bax* یکی از اعضای خانواده ژن *BCL-2* است که باعث افزایش آپوپتوز می‌گردد. پروتئین شناخته شده Bcl-2 یک کمپلکس هترودایمر با پروتئین Bax در داخل سلول تشکیل می‌دهد و نسبت BCL-2 به Bax در این که آیا آپوپتوز القا و یا مهار شود، بسیار تعیین‌کننده می‌باشد(۲۴، ۲۳).

پروتئین Bax که یکی از ژن‌های هدف *p53* است، کنترل مرگ سلولی را از طریق اخلال در میتوکندری، رها شدن سیتوکروم c از میتوکندری و در نهایت فعال شدن کاسپاز ۳ انجام می‌دهد(۲۵). برای بررسی مکانیسم اثر ضد سرطانی کافئین علیه سلول‌های NB4 ، فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ و هم چنین تغییر بیان ژن‌های *Bax* و *p21* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که کافئین به صورت وابسته به دوز موجب القای فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ و افزایش بیان mRNA ژن *Bax* و *p21* می‌گردد. در همین راستا، دوبرز و همکاران گزارش کرده‌اند که کافئین موجب افزایش حساسیت سلول‌های رده H358 (سلول غیر کوچک سرطان ریه انسان) به آپوپتوز وابسته به p53 از طریق انتقال پروتئین Bax به داخل میتوکندری می‌شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که کافئین موجب مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد NB4 می‌شود؛ از جمله مکانیسم‌های دخیل در ایجاد آپوپتوز توسط کافئین می‌توان به افزایش بیان ژن‌های *Bax* و *p21* و هم چنین فعال شدن آنزیم کاسپاز ۳ اشاره کرد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مصرف کافئین به عنوان ماده‌ای در چای می‌تواند یک عامل مفید در القای مرگ سلولی در سلول‌های لوسمی پرومیلوسیتیک حاد عمل کند.

References :

1- Benner SE, Hong WK. Clinical chemoprevention: developing a cancer prevention strategy. J Natl Cancer Inst 1993; 85(18): 1446-7.
2- Kelloff GJ. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. Adv Cancer Res 2000; 78: 199-334.
3- Qi W, Qiao D, Martinez JD. Caffeine induces TP53-independent G(1)-phase arrest and apoptosis in human lung tumor cells in a dose-dependent manner. Radiat Res 2002; 157(2): 166-74.
4- Lou YR, Lu YP, Xie JG, Huang MT, Conney AH. Effects of oral administration of tea, decaffeinated tea, and caffeine on the formation and growth of tumors in high-risk SKH-1 mice previously treated with ultraviolet B light. Nutr Cancer 1999; 33(2): 146-53.
5- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1999; 341(14): 1051-62.
6- Mantadakis E, Samonis G, Kalmanti M. A comprehensive review of acute promyelocytic leukemia in children. Acta Haematol 2008; 119(2): 73-82.
7- de The H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. Nat Rev Cancer 2010; 10(11): 775-83.
8- Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, *et al*. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. Science 2010; 328(5975): 240-3.
9- Vogel MW. Cell death, Bcl-2, Bax, and the cerebellum. Cerebellum 2002; 1(4): 277-87.
10- Wang X, Gao P, Long M, Lin F, Wei JX, Ren JH, *et al*. Essential role of cell cycle regulatory genes p21 and p27 expression in inhibition of breast cancer cells by arsenic trioxide. Med Oncol 2011; 28(4): 1225-54.
11- Blagonravov ML. Induction of caspase cascade as a nonspecific response to myocardial damage. Bull Exp Biol Med 2011; 151(2): 167-70.
12- Hui KK, Kanungo AK, Elia AJ, Henderson JT. Caspase-3 deficiency reveals a physiologic role for Smac/DIABLO in regulating programmed cell death. Cell Death Differ 2011; 18(11): 1780-90.
13- Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, *et al*. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. Nat Med 2011; 17(7): 860-6.
14- Dai Y, Yu C, Singh V, Tang L, Wang Z, McInistry R, et al. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. Cancer Res 2001; 61(13): 5106-15.
15- Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, *et al*. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. Cancer Res 1999; 59(17): 4375-82.
16- Nghiem P, Park PK, Kim Y, Vaziri C, Schreiber SL. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(16): 9092-7.
17- Jacquet P, de Saint-Georges L, Barrio S, Baugnet-Mahieu L. Morphological effects of caffeine, okadaic acid and genistein in one-cell mouse embryos blocked in G2 by X-irradiation. Int J Radiat Biol 1995; 67(3): 347-58.
18- Narayanan PK, Rudnick JM, Walthers EA, Crissman HA. Modulation in cell cycle and cyclin B1 expression in irradiated HeLa cells and normal human skin fibroblasts treated with staurosporine and caffeine. Exp Cell Res 1997; 233(1): 118-27.
19- Tsuchiya H, Tomita K, Yamamoto N, Mori Y, Asada N. Caffeine-potentiated chemotherapy and conservative surgery for high-grade soft-tissue sarcoma. Anticancer Res 1998; 18(5B): 3651-6.
20- Shinomiya N, Takemura T, Iwamoto K, Rokutanda M. Caffeine induces S-phase apoptosis in cis-diamminedichloroplatinum-treated cells, whereas cis-diamminedichloroplatinum induces a block in G2/M. Cytometry 1997; 27(4): 365-73.
21- Hagan MP, Hopcia KL, Sylvester FC, Held KD. Caffeine-induced apoptosis reveals a persistent lesion after treatment with bromodeoxyuridine and ultraviolet-B light. Radiat Res 1997; 147(6): 674-9.
22- Dubrez L, Coll JL, Hurbin A, Solary E, Favrot MC. Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. J Biol Chem 2001; 276(42): 38980-7.
23- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993; 74(4): 609-19.
24- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, *et al*. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science 1998; 281(5385): 2027-31.
25- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer 2002; 2(9): 647-56.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 12(4): 331-339

Original Article

Induction of cell death and decreased cell proliferation in acute promyelocytic leukemia cells (NB4) by caffeine

Safa M.[1], Bashash D.[2], Hamidpour M.[3]

[1]Hematology Department, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Prevention, control and treatment of cancer using natural materials currently have been considered as the promising strategy. In this regard, caffeine as a purine alkaloid found in various plants, including coffee, cocoa, cola and tea has recently attracted great interest because of its remarkable multifunctional inhibitory effects on cancers such as leukemia. Regarding the anti-cancer effects of caffeine, we sought to investigate the effectiveness of this methylxanthine alkaloid against NB4 acute promyelocytic leukemia cells.

Materials and Methods

In order to examine the effects of caffeine in APL, NB4 cells were cultured in the presence of different concentrations of caffeine; subsequently, MTT, Caspase 3 activity assay, BrdU cell proliferation assay and quantitative real-time PCR were performed to assess the effect of caffeine on cell viability and the possible mechanisms of inducing cell death.

Results

Evaluation of DNA synthesis and cell survival using BrdU and MTT methods indicated that caffeine reduces proliferation and survival of NB4 cells in a dose and time dependent manner. The results of this study showed that elevation in the dose of caffeine induces caspase-3 activation and increases Bax and p21 gene mRNA expression levels.

Conclusions

Overall, our data illustrate that caffeine inhibits cell proliferation and induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia NB4 cells. Thus, it can be concluded that caffeine as a substance in tea may be a useful agent for induction of cell death in malignant cells of patients with acute promyelocytic leukemia.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, Apoptosis, Caffeine, Caspases

Received: 27 Jul 2014
Accepted: 9 Jun 2015

Correspondence: Safa M., PhD of Hematology & Blood Banking. Assiatant Professor of Hematology Department, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences.
Postal Code: 1449614535, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 86704711; Fax: (+9821) 88622576
E-mail: *safa.m@iums.ac.ir*
Correspondence: Bashash D., PhD of Hematology & Blood Banking. Assiatant Professor of Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
Postal Code: 1971653312, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22721150
E-mail: *david_5980@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-20]