نقش مهارکننده‌های انتخابی آنزیم Cox-2 بر ژن HIF-1 alpha در سرطان کولورکتال: یک مطالعه In vitro

ساناز ریسمانچی[1*]
پژمان مرتضوی[1]
سعید امانپور[2]

۱- گروه پاتولوژی دامپزشکی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، انتهای شهید ستاری، میدان دانشگاه، بلوار شمدای حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تلفن: ۰۲۱-۴۷۹۱۱
E-mail: s.rismanchi88@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۱۵ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۷/۱۵

زمینه و هدف: سرطان کولورکتال از مهمترین سرطان‌ها در جوامع انسانی محسوب می‌شود و در دو دهه اخیر متوجه شده‌اند که مهارکننده‌های انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (Cox-2) باعث پسرفت تومور می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی مسیر مولکولی مهار آنژیوژنز توسط داروی سلکوکسیب بود.

روش بررسی: مطالعه تجربی حاضر در فاصله زمانی سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹۳ در مرکز پژوهش‌های مدل‌های سرطان و آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو کانسر ایران انجام شد. رده سلولی HCT-116 (جدا شده از آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی) پس از کشت و پاساژ، با ماده فعال سلکوکسیب در دو غلظت فارماکولوژیکی ۵۰ میکرومولار (C_{50}) و ۱۰۰ میکرومولار (C_{100})، تیمار گردید. سپس RNA استخراج و cDNA ساخته شد. الیگونوکلئوتید ژن HIF-1 alpha (ژن آغازگر آنژیوژنز) ساخته شده و میزان بیان ژن HIF-1 alpha توسط دستگاه Real-time PCR در سه گروه کنترل، C_{50} و C_{100} مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن HIF-1 alpha در گروه تیمار با سلکوکسیب و در غلظت C_{100} در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کاهش یافت ($P<0/001$). اما در غلظت C_{50} تغییری دیده نشد.

نتیجه‌گیری: سلکوکسیب با کاهش بیان ژنی موجب کاهش آنژیوژنز در بافت سرطان کولورکتال در محیط In vitro گردید.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، مهارکننده انتخابی Cox-2، آنژیوژنز، ژن HIF-1 alpha.

مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer, CRC) از مهمترین سرطان‌های انسانی بوده و آمارها نشان می‌دهد در ایالات متحده آمریکا پس از تومورهای ریوی، سرطان کولورکتال دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها می‌باشد.[1] اگرچه در ایران آمار دقیقی از این سرطان در دست نیست، اما برخی از مطالعات نشان می‌دهند CRC چهارمین سرطان شایع مردان ایرانی است.[2] غیر از عوامل ژنتیکی و ارثی، تغییر در سبک زندگی باعث شده است رخداد این بیماری در ایران بالا برود.[2] در حال حاضر جراحی اصلی‌ترین درمان این بیماری محسوب شده و شیمی‌درمانی و پرتودرمانی نیز از درمان‌های کمکی قبل و پس از جراحی به‌شمار می‌روند. به‌تازگی درمان‌های هدفمند (Targeted therapy) نیز به رژیم درمانی این سرطان اضافه شده و اثربخشی این داروها به شناخت مسیرهای مولکولی در CRC مربوط می‌گردد. یکی از این داروها Bevacizumab (Avastin®) بوده که دارای اثرات ضد آنژیوژنز توموری می‌باشد.[3]

بیماری‌های التهابی روده (IBD) یکی از عوامل مهم در القای این سرطان محسوب شده و مطالعات متعددی نشان می‌دهند که IBD به‌همراه کولیت اولسراتیو از عوامل خطر به‌شمار می‌روند.[4] از طرفی مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده‌اند افرادی که به‌مدت طولانی از

داروهای ضد التهاب غیر استروییدی (NSAIDs) استفاده نموده‌اند، خطر ابتلای به CRC به‌صورت معناداری کاهش یافته است.[۵] مطالعات بعدی نشان داد که بیان ژن‌های مربوط به آنزیم سیکلواکسیژناز-۲ (Cox-2) در اغلب سرطان‌های کولورکتال بالا می‌باشد. همچنین استفاده از NSAIDs و مهارکننده‌های انتخابی Cox-2 سبب بهبودی نسبی در سیر درمانی موارد پیشرفته نیز شده است.[۶] داروی سلکوکسیب (Celecoxib) مهمترین داروی مهارکننده انتخابی Cox-2 بوده و شواهد بالینی و پایه‌ای زیادی در دسترس است که درمان با این دارو به سود بیماران CRC می‌باشد.[۶] اما مکانیسم مولکولی آن و مسیرهای مولکولی مهار تهاجم و متاستاز توسط این دارو به‌خوبی درک نشده است.[۷]

برخی‌ها معتقدند اثر ضد توموری این دارو مربوط به مهار پروستاگلندین-E2 (PGE2) در چرخه سنتز آنزیم Cox-2 بوده و اثرات ضد تزاید (Anti-proliferative)، ضد رگ‌زایی (Anti-angiogenesis) و القای آپوپتوز را به مهار PGE2 پاتولوژیک نسبت می‌دهند.[۸] در حال حاضر مکانیسم‌های مولکولی ضد رگ‌زایی آن ناشناخته بوده و اطلاعات چندانی در مورد مهار مسیرهای آنژیوژنز ناشی از این دارو در دسترس نیست. اما شواهد کافی وجود دارد که یکی از اثرات ضد توموری این دارو مهار آنژیوژنز است.[۹]

ژن Hypoxia-inducible factor -1 alpha (HIF-1 alpha) به‌عنوان یک عامل مهم در روند آنژیوژنز فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بوده و جزو ژن‌های رونویسی محسوب شده و در پاسخ به کاهش اکسیژن به میزان زیاد بیان می‌گردد.[۱۰] این ژن سبب به راه افتادن مسیر آبشاری از ژن‌ها و ساخته شدن پروتیین‌هایی می‌شود که در نهایت فاکتور رشد اندوتلیالی (VEGF) ساخته شده و رگ‌های جدیدی جوانه بزنند.[۱۰] در این مطالعه تلاش شده است مسیر بیولوژیکی اثر ضد آنژیوژنز مهارکننده انتخابی Cox-2 در سرطان کولورکتال مطالعه شده و مکانیسم مولکولی آن بر روی ژن HIF-1 alpha در غلظت‌های فارماکولوژیک متفاوت مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات تجربی بوده و کلیه مراحل مطالعاتی آن در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان و همچنین آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو کانسر ایران و در فاصله زمانی سال‌های ۹۳-۱۳۹۱ انجام گرفت. این مطالعه در دو فاز طراحی و اجرا شد.

کشت سلولی و تیمار آن با سلکوکسیب: رده سلولی HCT-116 (جدا شده از آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی با بیان ژن Cox-2 در حداقل میزان) از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (high glucose) همراه با FBS کشت داده شدند. برای جلوگیری از رشد پاتوژن‌ها از Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) استفاده شد. پس از انکوبه شدن در دمای ۳۷ °C و رطوبت ۹۰٪، سلول‌ها در داخل هود کلاس II با PBS شستشو داده شده و برای جدا شدن سلول‌ها از هم از Tripsin-EDTA استفاده شد. پس از سانتریفیوژ شدن، سلول‌ها در زیر میکروسکوپ اینورت Inverted Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) شمارش شده و زمانی‌که چگالی سلولی به ۴۰۰ هزار سلول به ازای هر ۲۵ cm^2 رسید، سلول‌ها به فلاسک جدید منتقل شده و پاساژ یافتند. این عمل چهار بار تکرار شد.

ماده فعال (Active substance) سلکوکسیب Celecoxib (Tehran Darou Pharmaceutical Co., Tehran, Iran) تهیه شد. غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ µm از این دارو به‌وسیله محلول DMSO و محیط کشت تهیه گردید. برای گروه پلاسبو از DMSO و محیط کشت فاقد سلکوکسیب استفاده شد. سلول‌ها در سه گروه کنترل با غلظت ۵۰ µm (C_{50}) سلکوکسیب و غلظت ۱۰۰ µm (C_{100}) آن تیمار شدند. هر دو غلظت یاد شده در محدوده فارماکولوژیک پلاسمای انسانی بوده و مطالعه در غلظت پایین و غلظت بالا طراحی و اجرا شد. نمونه‌ها پس از کددهی به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی فرستاده شدند.

استخراج RNA تا آنالیز نتایج Real-time PCR: استخراج RNA از هر سه گروه این مطالعه به‌وسیله کیت استخراج CinnaPure RNA Purification Kit (CinnaGen Co., Karaj, Iran)® و مطابق با بروشور شرکت سازنده انجام شد. در ادامه Optimal Density (OD) محاسبه و چگالی ماده استخراجی ارزیابی شد. پرایمر ژن HIF-1 alpha با استفاده از سایت NCBI و نرم‌افزار Primer-BLAST® طراحی و الیگونوکلئوتید توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شد (جدول ۱). برای سنتز DNA آزمایشگاهی (cDNA) از روی RNA، از کیت Tag DNA Polymerase-KBC® (Kawsar Biotech Co., Tehran, Iran) استفاده شد و پروسه سنتز cDNA مطابق بروشور شرکت سازنده انجام گرفت.

جدول ۱: سنتز توالی الیگونوکلئوتید ژن HIF-1 alpha براساس پرایمر پیشنهادی زیر

HIf-1 alpha gene	*Forward*: 5'- TCATGAATGTTTCCCTGCAA-3'
	Reverse: 5'- GGGGACACCATTAGCATGAC-3'

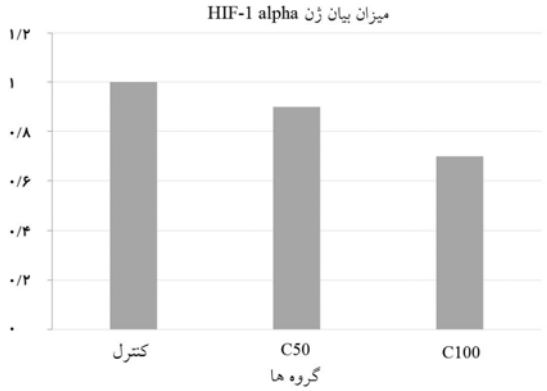
در نهایت هر نمونه در سه میکروتیوپ قرار داده شد و توسط دستگاه Real-time PCR و با استفاده از Master mix EvaGreen® (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) هر میکروتیوپ سه بار طیف‌سنجی شد. میانگین چرخه آستانه (CT) به‌دست آمده و نرمال‌سازی با استفاده از ژن خانه‌دار Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) انجام گرفت. منحنی استاندارد رسم شده و میزان بیان ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به‌دست آمد. در نهایت توسط آزمون آماری One-way ANOVA سطح معناداری آن محاسبه و از آزمون تکمیلی آماری Bonferroni برای ارزیابی ارتباط غلظت‌های C_{50} با گروه کنترل، C_{100} با گروه کنترل و رابطه C_{50} با C_{100} به‌دست آمد. هدف از این تست مقایسه نتایج گروه‌ها با هم بود. سطح معناداری P<۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها

میزان بیان ژن HIF-1 alpha در رده سلولی HCT-116 در هر سه گروه پلاسبو، غلظت C_{50} و غلظت C_{100} نمایش داده شد (نمودار ۱). در گروه تیمار با سلکوکسیب، نسبت به گروه کنترل، بیان ژن HIF-1 alpha به‌صورت معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). نتایج آماری تکمیلی نشان داد که در غلظت C_{50} واریانس معناداری با گروه کنترل مشاهده نشده و بیان ژن HIF-1 alpha تغییر معناداری نکرد. در حالی‌که در غلظت C_{100} از نظر آماری معنادار بود (P=۰/۰۳). مقایسه دو غلظت C_{50} و C_{100} سلکوکسیب نشان داد که در غلظت بالا (C_{100})، اثر مهاری بیان ژن HIF-1 alpha در مقایسه با غلظت پایین (C_{50})، به‌طور معناداری متفاوت بود (P=۰/۰٤).

بحث

نتایـج مطالعه حاضر بر روی رده سلولی سرطان کولورکتال نشان



نمودار ۱: اثر سلکوکسیب بر رونویسی ژن HIF-1 alpha. بیان mRNA با استفاده Real-time- PCR در سه گروه پس از نرمال‌سازی و اندازه‌گیری CT با استفاده ژن GAPDH. محور افقی: گروه دارویی سلکوکسیب، محور عمودی: میزان بیان ژن HIF-1 alpha

داد که بیان ژن HIF-1 alpha در مواجهه با مهارکننده انتخابی آنزیم Cox-2 (در غلظت فارماکولوژیکی بالا) به‌طور معناداری کاهش یافته است. ژن HIF-1 alpha پروتیینی را کد می‌کند که در پاسخ به هیپوکسی آزاد شده و استارت آبشار آنژیوژنز توموری زده شده و در نهایت عروق جدیدی برای تغذیه سلول‌های توموری شکل می‌گیرد. امروزه مهار آنژیوژنز به برخی از پروتکل‌های درمانی سرطان‌ها اضافه شده و در سال ۲۰۰٤ میلادی از سوی سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA)، آنتی‌بادی مونوکلونال Bevacizumab (Avastin, Genentech, San Francisco, CA, USA) مجوز مصرف را در سرطان کولورکتال متاستاتیک دریافت نمود. این دارو بسیار گرانقیمت بوده و هزینه اثربخشی (Cost-effectiveness) بالای آن از یک طرف و عوارض جانبی آن از سوی دیگر سبب شده است که کاربرد آن در کشورهای کمتر توسعه یافته محدود شود.[11] داروی سلکوکسیب دارویی ارزان بوده و شواهد زیادی در دسترس است که استفاده از این دارو در متاستازهای CRC به‌نفع بیماران بوده است. اگرچه اثر محافظتی NSAIDs در سرطان کولورکتال مشخص شده و نقش درمانی آنها نیز در پسرفت تومور مشاهده شده است، اما مهمترین محدودیت آن، عوارض جانبی در مصرف‌های طولانی‌مدت می‌باشد. در حالیکه مهارکننده‌های انتخاب Cox-2 دارای عوارض جانبی کمتری بوده و می‌تواند در پیشگیری و درمان CRC مطرح باشد.

Thakkar و Kim و همکاران نشان دادند که سلکوکسیب باعث کاهش تعداد پولیپ‌های آدنوماتوز در کودکان می‌شود.[۱۲و۱۳] Sunborn و همکاران نشان دادند که درمان با سلکوکسیب در CRC فامیلی به نفع بیماران می‌باشد.[۱٤]

Aghili و همکاران، طی یک مطالعه که تنها پژوهش بالینی اثربخشی سلکوکسیب بر روی سرطان کولورکتال در ایران است، به این نتیجه رسیدند که در سرطان کولورکتال Stage II-III، سلکوکسیب به‌همراه شیمی‌درمانی و پرتودرمانی باعث ارتقای پاسخ کامل پاتولوژیکی (Pathological complete response) در درمان نئوادجوانت (قبل از جراحی برای کاهش حجم توده بدخیم) می‌شود.[۱۵] یکی از دلایل پسرفت تومور در درمان با مهارکننده‌های انتخابی Cox-2، به اثرات ضد رگ‌زایی آن نسبت داده می‌شود. Klenke و همکاران در یک مطالعه بر روی مدل تجربی سرطان ریه نشان دادند که سلکوکسیب باعث کاهش آنژیوژنز توموری خواهد شد.[۱٦] همچنین Hada و همکاران، در سرطان لوزالمعده به چنین نتیجه مشابهی دست یافته بودند.[۱۷]

Liu و همکاران، پسرفت تومور پستانی و تومور ریه مدل تجربی را به اثر ضد آنژیوژنز سلکوکسیب نسبت دادند.[۱۸] Ninomiya و همکاران، در مدل زنوگرافت سرطان کولون، دریافتند که سلکوکسیب سبب کاهش فاکتور رشد اندوتلیالی (VEGF) گردیده و کاهش آنژیوژنز توموری از آن طریق می‌باشد.[۱۹] Dovizio و همکاران نشان دادند که مهارکننده‌های انتخابی Cox-2 باعث می‌شود که میزان آنژیوژنز پولیپ‌های آدنوماتوز فامیلی به‌صورت معناداری کاهش یابد.[۲۰] نکته مهمی که در مطالعات مشابه بر روی آن تأکید می‌گردد، شناخت مسیرهای مولکولی و ژن‌های درگیر در این فرایند بوده که سلکوکسیب به‌وسیله مهار این مسیرهای مولکولی، توانسته است آنژیوژنز توموری را کاهش دهد.

هدف ما در مطالعه حاضر، ارزیابی ژن آغازگر و محرک آبشار آنژیوژنز در سرطان کولورکتال بود. شواهد زیادی در دسترس بوده که مهار ژن و یا پروتیین HIF-1 alpha باعث اختلال در مسیر آنژیوژنز توموری شده و به‌دنبال آن رشد تومور کاهش می‌یابد. Feng و همکاران، بیان بالای این ژن را در سرطان‌های رکتوم با افزایش آنژیوژنز، کاهش آپوپتوز و کاهش میزان بقا در بیماران در ارتباط دانستند.[۲۱] با افزایش این مطالعه در راستای بررسی مکانیسم‌های مولکولی این دارو بر روی سرطان کولورکتال بوده و نتایج آن نشان داد که سلکوکسیب در غلظت فارماکولوژیکی C_{100} سبب کاهش بیان ژن HIF-1 alpha شد. از طرفی نتایج این مطالعه نشان داد که در C_{50} تأثیری نداشته اما بین غلظت‌های C_{50} و C_{100} رابطه معنادار است. دلیل چنین پدیده‌ای در فارماکولوژی، ناشی از وابسته بودن پاسخ دارو به دوز بوده و نشان می‌دهد مصرف دوز پایین (Low dose) داروی سلکوکسیب در سرطان کولورکتال، فاقد اثرات مهارکننده آنژیوژنزی است. به دارو به‌طور کلی مهارکننده‌های انتخابی Cox-2 نسبت به سایر NSAIDs، دارای عوارض جانبی کمتری است. با توجه به اینکه انتخاب دوزهای درمانی در این مطالعه برحسب غلظت‌های فارماکولوژیکی در پلاسمای انسانی انتخاب شده است، از این روی از نظر تحقیقات ترجمه‌ای (Translational research)، نتایج این مطالعه قابلیت تعمیم-پذیری را به فاز انسانی دارا است.

با عنایت به نتایج مطالعه حاضر و شناسایی یکی از مولکول‌های هدف این دارو در کنترل آنژیوژنز توموری، لازم است در مطالعات بعدی ژن‌ها و مولکول‌های دیگری در مسیر مهار آنژیوژنز شناسایی شوند. امید می‌رود با شناسایی کامل مسیرهای مهم تأثیرگذار این دارو، از مهارکننده‌های آنزیم Cox-2 به‌عنوان داروی خط اول ضد توموری در کنار سایر داروهای شیمی‌درمانی استاندارد در سرطان‌های کولورکتال استفاده شود. این مطالعه پایه‌ای در راستای افزایش قدرت مدارک پایه‌ای (Evidence-based) برای اثرات ضد توموری سلکوکسیب انجام شد.

سپاسگزاری: نتایج این مقاله به‌عنوان بخشی از پروژه انجام یافته در مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان انستیتو کانسر ایران دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده (کد ۱۸۲۵۸-۵۱-۰۲-۹۱) و این مقاله از پایان‌نامه دکترای عمومی ساناز ریسمانچی استخراج شده است.

نویسندگان از دکتر احد محمدنژاد و دکتر صمد محمدنژاد به‌عنوان مجریان این طرح پژوهشی، دکتر رضا شیرکوهی مجری و مشاور ژنتیکی این پروژه تحقیقاتی صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند. همچنین از دکتر مجتبی صفاری که زحمت آزمون‌های Real-time PCR را بر عهده داشتند تقدیر می‌گردد. از خانم حدادی، خانم اخوان و خانم دکتر عبدالملکی در همکاری با این طرح قدردانی می‌شود. لازم است از شرکت دارویی "تهران دارو" و مدیر عامل محترم آن که ماده فعال سلکوکسیب را به رایگان در اختیار تیم پژوهشی قرار دادند تشکر گردد.

References

1. Allemani C, Rachet B, Weir HK, Richardson LC, Lepage C, Faivre J, et al. Colorectal cancer survival in the USA and Europe: a CONCORD high-resolution study. *BMJ Open* 2013;3(9):e003055.
2. Abdifard E, Ghaderi S, Hosseini S, Heidari M. Incidence trends of colorectal cancer in the West of Iran during 2000-2005. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14(3):1807-11.
3. Dai F, Shu L, Bian Y, Wang Z, Yang Z, Chu W, et al. Safety of bevacizumab in treating metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of all randomized clinical trials. *Clin Drug Investig* 2013;33(11):779-88.
4. Andersen NN, Jess T. Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased?. *World J Gastroenterol* 2013; 19(43):7561-8.
5. Stolfi C, De Simone V, Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and mesalazine in the chemoprevention of colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2013;14(9):17972-85.
6. Iwama T. NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J Gastroenterol* 2009;44 Suppl 19:72-6.
7. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):R422-35.
8. Salimi M, Esfahani M, Habibzadeh N, Aslani HR, Amanzadeh A, Esfandiary M, et al. Change in nicotine-induced VEGF, PGE2 AND COX-2 expression following COX inhibition in human oral squamous cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2012;31(4):349-56.
9. Kumar BN, Rajput S, Dey KK, Parekh A, Das S, Mazumdar A, et al. Celecoxib alleviates tamoxifen-instigated angiogenic effects by ROS-dependent VEGF/VEGFR2 autocrine signaling. *BMC Cancer* 2013;13:273.
10. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358(19):2039-49.
11. Ruiz-Millo O, Albert-Mari A, Sendra-Garcia A, Jimenez-Torres NV. Comparative cost-effectiveness of bevacizumab-irinotecan-fluorouracil versus irinotecan-fluorouracil in first-line metastatic colorectal cancer. *J Oncol Pharm Pract* 2014;20(5):341-50.
12. Thakkar K, Fishman DS, Gilger MA. Colorectal polyps in childhood. *Curr Opin Pediatr* 2012;24(5):632-7.
13. Kim B, Giardiello FM. Chemoprevention in familial adenomatous polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25(4-5):607-22.
14. Sanborn R, Blanke CD. Cyclooxygenase-2 inhibition in colorectal cancer: boom or bust? *Semin Oncol* 2005;32(1):69-75.
15. Aghili M, Babaei M, Azmoode Ardalan F, Farhan F, Hadad M, Ganjalikhani M. Neoadjuvant chemoradiation with capcitabine and celecoxib in stage II. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2010;68(7):391-7.
16. Klenke FM, Abdollahi A, Bischof M, Gebhard MM, Ewerbeck V, Huber PE, et al. Celecoxib enhances radiation response of secondary bone tumors of a human non-small cell lung cancer via antiangiogenesis in vivo. *Strahlenther Onkol* 2011;187(1):45-51.
17. Hada M, Mizutari K. A case of advanced pancreatic cancer with remarkable response to thalidomide, celecoxib and gemcitabine. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004;31(6):959-61.
18. Liu W, Chen Y, Wang W, Keng P, Finkelstein J, Hu D, et al. Combination of radiation and celebrex (celecoxib) reduce mammary and lung tumor growth. *Am J Clin Oncol* 2003;26(4):S103-9.
19. Ninomiya I, Nagai N, Oyama K, Hayashi H, Tajima H, Kitagawa H, et al. Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib on human colorectal carcinoma xenografts in nude mouse rectum. *Oncol Rep* 2012;28(3):777-84.
20. Dovizio M, Tacconelli S, Ricciotti E, Bruno A, Maier TJ, Anzellotti P, et al. Effects of celecoxib on prostanoid biosynthesis and circulating angiogenesis proteins in familial adenomatous polyposis. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341(1):242-50.
21. Feng L, Tao L, Dawei H, Xuliang L, Xiaodong L. HIF-1α expression correlates with cellular apoptosis, angiogenesis and clinical prognosis in rectal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2014;20(3):603-10.

TUMJ Tehran University Medical Journal, October 2014; Vol. 72, No. 7: 443-448 Original Article

The role of selective Cox-2 inhibitors on HIF-1 alpha gene in colorectal cancer: an in-vitro study

Sanaz Rismanchi D.V.M[1*]
Pejman Mortazavi D.V.M., Ph.D.[1]
Saeid Amanpour D.V.M., DVSc.[2]

1- Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Cancer Models Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Science and Research Branch, Hesarak, Tehran, Iran, 1477893835
Tel: +98-21-47911
E-mail: s.rismanchi88@gmail.com

Abstract

Received: 19 Feb. 2014 Accepted: 06 Aug. 2014 Available online: 07 Oct. 2014

Background: Colorectal cancer is a major cause of morbidity and mortality throughout the world, and its treatments include surgery, chemo-radiotherapy. Despite improvements in clinical outcomes of patients with this tumor over the past decades, prognosis remains poor with a 5-year survival rate of <10%. Angiogenesis inhibitor agents have been recently added to the treatment regimen of this disease. In the past two decades, it has been recognized that selective inhibitors of the cyclooxygenase -2 (Cox-2) enzyme result in the regression in the size of colorectal tumor, and one of its reasons is attributed to angiogenesis inhibition. The present study aimed at identifying the molecular pathways of angiogenesis inhibition by celecoxib.

Methods: HCT-116, which is one of the cell lines of Colorectal cancer (separated from human colorectal adenocarcinoma) was provided by the National Cell bank of Iran (NCBI) affiliated to Pasteur Institute. It was then cultured in DMEM (high glucose) culture medium containing 10% FBS, and then treated in the active substance of celecoxib at pharmacological concentrations of 50 mM (C_{50}) and 100 mM (C_{100}). Afterwards, RNA was extracted and cDNA was prepared. The oligonucleotide of HIF-1 Alpha gene (angiogenesis initiator) was prepared and the level of HIF-1 alpha gene expression was assessed with a real-time PCR device in three control, C_{50} and C_{100} groups.

Results: HIF-1 alpha gene expression significantly decreased in the celecoxib treatment group (compared with control group) with the concentration of C_{100} ($P< 0.001$), but no change was observed in the concentration of C_{50}.

Conclusion: Angiogenesis is a key factor in the carcinogenesis process and FDA today approved bevacizumab as a first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer. The results of this study showed one of the causes of angiogenesis reduction in celecoxib-treated colorectal cancer. According to clinical findings and basic studies, celecoxib will be hopefully used as a first-line therapy along with chemotherapy in the near future in colorectal cancer. The advantages of this treatment method include its low cost and low side effects.

Keywords: angiogenesis, colorectal neoplasms, cyclooxygenase 2 inhibitors, hypoxia-inducible factor 1.