مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۹۷، خرداد و تیر ۱۳۹۴، صفحات ۲۱ تا ۳۳

افزایش اثرات درمانی سیس پلاتین و 5- فلورواوراسیل بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 با استفاده از تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید تمام ترانس

اسدالله عباسی[۱]، دکتر مجتبی امانی[۲]، دکتر نوروز نجف‌زاده[۳]، یاسین یلمه‌ها[۴]، دکتر محمد ماذنی[۵]، سینا فکور[۶]

نویسنده‌ی مسوول: اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده‌ی پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی n.najafzade@arums.ac.ir

دریافت: ۹۲/۱۲/۸ پذیرش: ۹۳/۷/۳

چکیده

زمینه و هدف: *رتینوئیک اسید اثرات قابل ملاحظه‌ای بر روی تنظیم رشد سلولی، تمایز و آپوپتـوز دارد. مطالعـات اخیـر نـشان دهنـده‌ی افـزایش مقاومت سلول‌های آدنوکارسینومای معده و کارسینوم سلول‌های سنگفرشی مری نسبت به داروهای شیمی درمانی سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل می‌باشد. لذا در این مطالعه اثرات سمیتی تیمار ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسـیل بـر روی رده‌هـای سلولی سرطان مری و معده بررسی شد.*

روش بررسی: *رده‌های سلولی آدنوکارسینوم معده (AGS) و کارسنیوم سلول سنگفرشی مری (KYSE-30) به مدت شش روز در محـیط کـشت RPMI-1640 حاوی غلظت‌های زیر سمیت (به‌ترتیب ۳/۶ و ۱۳/۶ میکرومول) رتینوئیک اسید کشت داده شدند و پس از ۷۲ ساعت تحت تیمار با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل قرار گرفتند. اثرات تیمار ترکیبی با روش‌های تعیین فعالیت متابولیکی، رنگ آمیزی آکریـدین اورنـج/ اتیدیوم بروماید و فلوسایتومتری بررسی شدند.*

یافته‌ها: *ارزیابی IC_{50} با روش فعالیت متابولیکی نشان داد تیمار ترکیبی اثرات سمیتی بیشتری بر روی هر دو رده سلولی داشت و با کاهش مقادیر IC_{50} داروها همراه بود. ($P<۰/۰۵$, $P<۰/۰۰۱$) رنگ آمیزی آکریدین اورنج /اتیدیوم بروماید نشان دهنده افزایش درصد سلول‌هـای آپوپتـوز در گروه تیمار ترکیبی نسبت به استفاده تنها از داروها بود. ($P<۰/۰۵$, $P<۰/۰۰۱$) علاوه بر آن، تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتـین باعـث افزایش توقف سلول‌ها در فاز G_2/M و تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل باعث افزایش توقف در فاز G_1/S شد ($P<۰/۰۰۱$)*

نتیجه‌گیری: *نتایج ما نشان داد تیمار ترکیبی غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسـیل موجـب افـزایش اثرات سمیتی این داروها بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 می‌شود.*

واژگان کلیدی: ***رتینوئیک اسید تمام ترانس، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل، رده سلولی AGS، رده سلولی KYSE-30***

مقدمه

سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان‌های شایع در جهان به‌شمار می‌روند. سرطان معده چهارمین سـرطان شـایع و دومین علت منجر به مرگ ناشـی از سـرطان‌هـا مـی‌باشـد. همچنین سرطان مری هشتمین سرطان شایع و ششمین علـت

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ۲- دکترای تخصصی بیوفیزیک، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
۳- دکترای تخصصی علوم تشریحی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ۴- دانشجوی کارشناسی پرستاری، دانشکده‌ی پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
۵- دکترای تخصصی بیوشیمی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ۶- دانشجوی کارشناسی بیهوشی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

منجر به مرگ ناشی از سرطان‌ها بوده است. از عوامل موثر در بروز این نوع سرطان می‌توان به‌مصرف دخانیات، مصرف الکل و بیماری بارتز Barretts Disease اشاره کرد (۲و ۱). استان اردبیل درحال حاضر از شایع‌ترین مناطق بروز سرطان مری و معده در ایران و جهان است و از بین سرطان‌های رایج در این استان سرطان مری و معده ۱/۳ درصد سرطان‌ها را شامل می‌شود (۳).

در حال حاضر شیمی درمانی از رایج‌ترین درمان‌های سرطان می‌باشد که جهت بالا بردن طول عمر بیماران انجام می‌شود. در روش‌های شیمی درمانی مرسوم از مواد شیمیایی که هدف آن‌ها DNA، RNA و یا پروتئین‌های سلولی است، جهت متوقف کردن تقسیم سلولی در سلول‌های سرطانی و مرگ آن‌ها استفاده می‌شود (۴).

سیس پلاتین و ۵- فلورواوراسیل از جمله داروهای مرسوم شیمی‌درمانی به شمار می روند. سیس پلاتین از طریق القای آسیب وسیع در سطح DNA (۵) و ۵- فلورواوراسیل با مسدود نمودن سنتز DNA (۴) در سلول سرطانی موجب توقف تقسیم و مرگ این سلول‌ها می‌شوند.

رتینوئیک اسید تمام ترانس یکی از متابولیت‌های فعال ویتامین A است که دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای بر روی رشد، تمایز و آپوپتوز سلول‌های اپی‌تلیالی سالم، پیش‌سرطانی و سرطانی است. به‌طور کلی رتینوئیدها در کنترل تمایز و تکثیر سلول‌های سنگفرشی در بافت‌های اپی تلیالی طبیعی و سرطانی نقش دارند که اخیرا استفاده از رتینوییدها به‌عنوان یک ترکیب موثر به‌صورت تیمار ترکیبی با داروهای شیمی درمانی جهت بهبود عملکرد این داروها پیشنهاد شده است (۶). مطالعات قبلی حاکی از این است که تیمار ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس با داروهای سیس پلاتین و ۵- فلوورواوراسیل باعث افزایش سمیت این داروها بر روی سرطان سلول سنگفرشی ملانوما (۷) و رده‌ی سلولی آدنوکارسینومای پانکراس می‌گردد (۸). لذا در مطالعه‌ی حاضر بر آن شدیم تا اثرات تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با داروهای سیس پلاتین و ۵- فلورواوراسیل بر روی رده‌های سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS) و سرطان سلول سنگفرشی مری (KYSE-30) را مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

این مطالعه‌ی تجربی از نوع بنیادی در آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل طی مدت ۶ ماه انجام شد.

کشت سلولی: رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی Fetal Bovine Serum و ۱ درصد محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور تحت دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2) نگهداری شد.

داروها: سیس پلاتین (Sigma-Germany) با دوز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت محلول آماده‌ی تزریق داخل وریدی تهیه شد. ۵- فلورواوراسیل (Sigma-Germany) یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت پودر در محلول Phosphate Buffer Saline (PBS) حل شد. رتینوئیک اسید تمام ترانس (Sigma-Germany) در محلول دی متیل سولفواکساید حل شد و غلظت‌های مختلف آن تا قبل از استفاده در یخچال نتیروژن دار ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶ برای هر سه دارو استفاده شد.

تعیین غلظت زیر سمیت رتینوئیک اسید: به‌منظور تعیین غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید، هر دو رده‌ی سلولی به مدت شش روز تحت تیمار با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید قرار گرفتند تا غلظتی که موجب مهار ۵۰ درصد فعالیت متابولیکی می‌شود (IC_{50}) تعیین گردد. ۴ ساعت قبل از اتمام دوره‌ی تیمار، محیط رویی سلول را خارج

و ۱۸۰ لاندا محیط تازه‌ی عاری از سرم به همراه ۲۰ لاندا رنگ 3-[4, 5 Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide MTT، ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر چاهک‌ها اضافه شد. پلیت دوباره انکوبه و سپس محیط آن را خارج و ۲۰۰ لاندا دی متیل سولفات به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت‌ریدر قرائت شد. غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید برای رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 به‌ترتیب ۳/۶ و ۱۳/۶ میکرومول تعیین گردید.

تیمار ترکیبی: رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 به مدت شش روز در حضور و عدم حضور غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید کشت داده شدند. سلول‌ها با PBS یک بار شستشو و با تریپسین EDTA از کف فلاسک جدا و توسط لام نئوبار شمارش شد. تعداد ۱۰ هزار عدد سلول در حجم ۱۰۰ لاندا در هر چاهک ازپلیت ۹۶ خانه کشت مجدد داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند. محیط کشت سلول‌ها با ۲۰۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف سیس‌پلاتین و ۵-فلورواوراسیل جایگزین شده و به مدت ۷۲ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه یافت در نهایت جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکرو پلیت ریدر قرائت شد (۹).

بررسی مرگ سلولی: جهت بررسی تغییرات مورفولوژیکی (آپوپتوز) سلول‌ها از روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید Acridine Orange/Ethidium Bromide استفاده شد. تعداد ۱۲ هزار سلول در هر پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد و سپس طبق برنامه به‌مدت شش روز با رتینوئیک اسید و به‌مدت ۷۲ ساعت با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل تیمار گردیدند. پس از اتمام دوره‌ی تیمار ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ میکروگرم آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید به هر چاهک اضافه شد. پنج دقیقه بعد با میکروسکوپ فلوئورسنت (Olympus) تصاویری تهیه شد که در آن ۳ نوع تغییر مورفولوژیکی را می‌توان مشاهده کرد که عبارتنداز: ۱- سلول‌های آپوپتوز اولیه با هسته‌های متراکم و قطعه قطعه شده ۲- سلول‌های آپوپتوز تاخیری با هسته‌های متراکم قرمز فلورئوسنت و قطعه‌قطعه شده ۳- سلول‌های نکروتیک با رنگ زرد متمایل به قرمز و یک دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته که همگی از سلول‌های سالم با رنگ سبز پررنگ قابل تشخیص می‌باشند. در نهایت تعداد سلول‌های آپوپتوزاولیه و آپوپتوز ثانویه و نکروتیک شمارش گردید.

چرخه‌ی سلولی: برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها جهت فلوسایتومتری محلول حاوی یک میلی‌گرم رنگ دپی در ۵۰ سی‌سی PBS تهیه شد. تعداد $۵×۱۰^۵$ سلول در هر خانه از پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد. سپس سلول طبق برنامه‌ی تیمار که قبلا ذکر شد، تیمار گردید. پس اتمام دوره‌ی تیمار، سلول‌ها با PBS شستشو و توسط ۳ سی‌سی الکل ۷۰ درصد تثبیت شدند و به‌مدت یک ساعت در یخچال چهار درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۷ سی‌سی PBS به سوسپانسیون سلولی اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۷۰۰ rpm (دور بر دقیقه) سانتریفوژ و یک سی‌سی محلول دپی 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) به رسوب سلولی اضافه گردید و هم زده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه‌ی مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی با دستگاه فلوسایتومتری بررسی شد.

تجزیه تحلیل داده‌ها: داده‌های مطالعه با استفاده از آزمون آماری ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی اختلاف بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده شد. سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ و $P<۰/۰۰۱$ در نظر گرفته شد. تمام مقادیر به‌صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است.

یافته‌ها

تعیین فعالیت متابولیکی: مطابق جدول ۱، ارزیابی

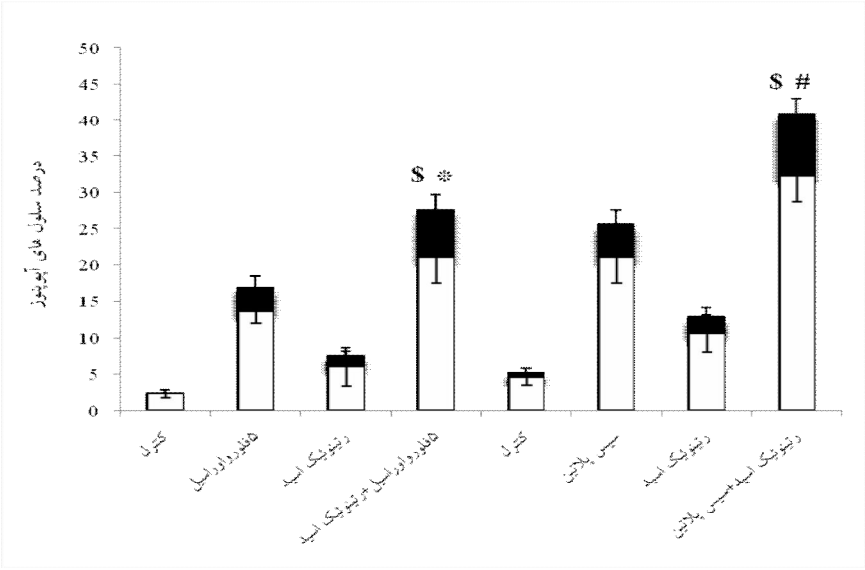
IC_{50} با روش تعیین فعالیت متابولیکی نشان داد که رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل خاصیت مهاری بر تکثیر سلولی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 داشته و تیمار ترکیبی با رتینوئیک اسید باعث کاهش قابل ملاحظه‌ی سلول‌ها نسبت به استفاده‌ی تنها از داروها گردید.

جدول ۱: مقادیر IC_{50} رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل و ترکیب آن‌ها بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30.
(مقادیر نشان داده شده بر اساس میانگین± انحراف معیار برای سه بار تکرار می‌باشد)

گروه‌ها	KYSE-30	AGS
رتینوئیک اسید تمام ترانس	۱۴/۶±۰/۸	۴/۶±۰/۷
سیس پلاتین	۲/۷۸±۰/۴۲	۳/۸۵±۰/۳۲
۵- فلورواوراسیل	۲/۱۶±۰/۲۵	۲/۴۹±۰/۳۵
رتینوئیک اسید تمام ترانس+ سیس پلاتین	۰/۷۳±۰/۲۱[a]	۱/۳۵±۰/۴۲[a]
رتینوئیک اسید تمام ترانس+۵-فلورواوراسیل	۰/۸±۰/۱[b]	۰/۷۲±۰/۱۶[b]

a: اختلاف معنی‌دار با گروه سیس پلاتین ($P < ۰/۰۱$) b: اختلاف معنی‌دار با گروه ۵- فلورواوراسیل ($P < ۰/۰۵$)

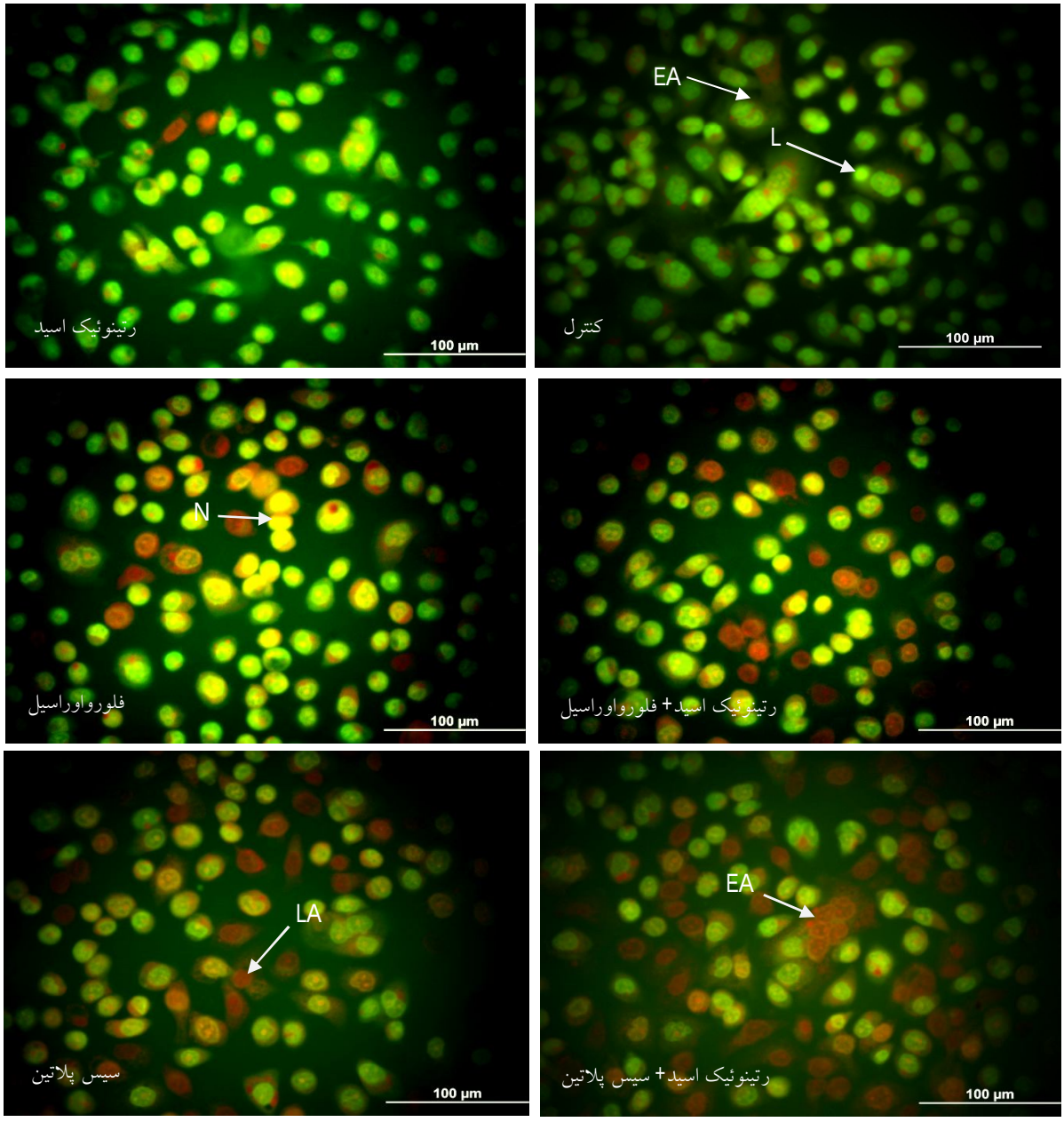
بررسی مرگ سلولی: اثرات القایی آپوپتوز رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل و تیمار ترکیبی آنها بر روی رده‌ی سلولی AGS نشان داد که تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با داروها منجر به افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز نسبت به استفاده تنها از داروها شد (نمودار ۱) درصد سلول‌های AGS آپوپتوز در تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین نسبت به تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل بیشتر بود.



نمودار ۱: درصد سلول‌های آپوپتوز رده‌ی سلولی AGS در گروه‌های مختلف تحت مطالعه

□ نشان دهنده‌ی آپوپتوز اولیه ■ نشان دهنده‌ی آپوپتوز ثانویه

اختلاف معنی‌دار با گروه ۵-فلورواوراسیل ($P< ۰/۰۰۱$) # اختلاف معنی‌دار با گروه سیس پلاتین ($P< ۰/۰۵$) $ اختلاف معنی‌دار با گروه رتینوئیک اسید ($P< ۰/۰۰۱$)



شکل ۱: تاثیر رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل وتیمار ترکیب آن‌ها را با رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتدیوم بروماید بر رده سلولی AGS (۲۰۰×). استفاده از ترکیب تیمار رتینوئیک اسید و ۵-فلورواوراسیل باعث افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه نسبت به استفاده تنها از ۵-فلورواوراسیل، سیس پلاتین و رتینوئیک اسید شد

L: Live, **N**: Necrosis, **EA**: Early Apoptosis, **LA**: Late Apoptosis

بررسی چرخه سلولی به وسیله فلوسایتومتری: اثرات تیمار با رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل و تیمار ترکیبی آن‌ها به وسیله آنالیز چرخه‌ی سلولی با فلوسایتومتری انجام شد. درصد سلول‌ها در مراحل G_1، S و G_2 چرخه

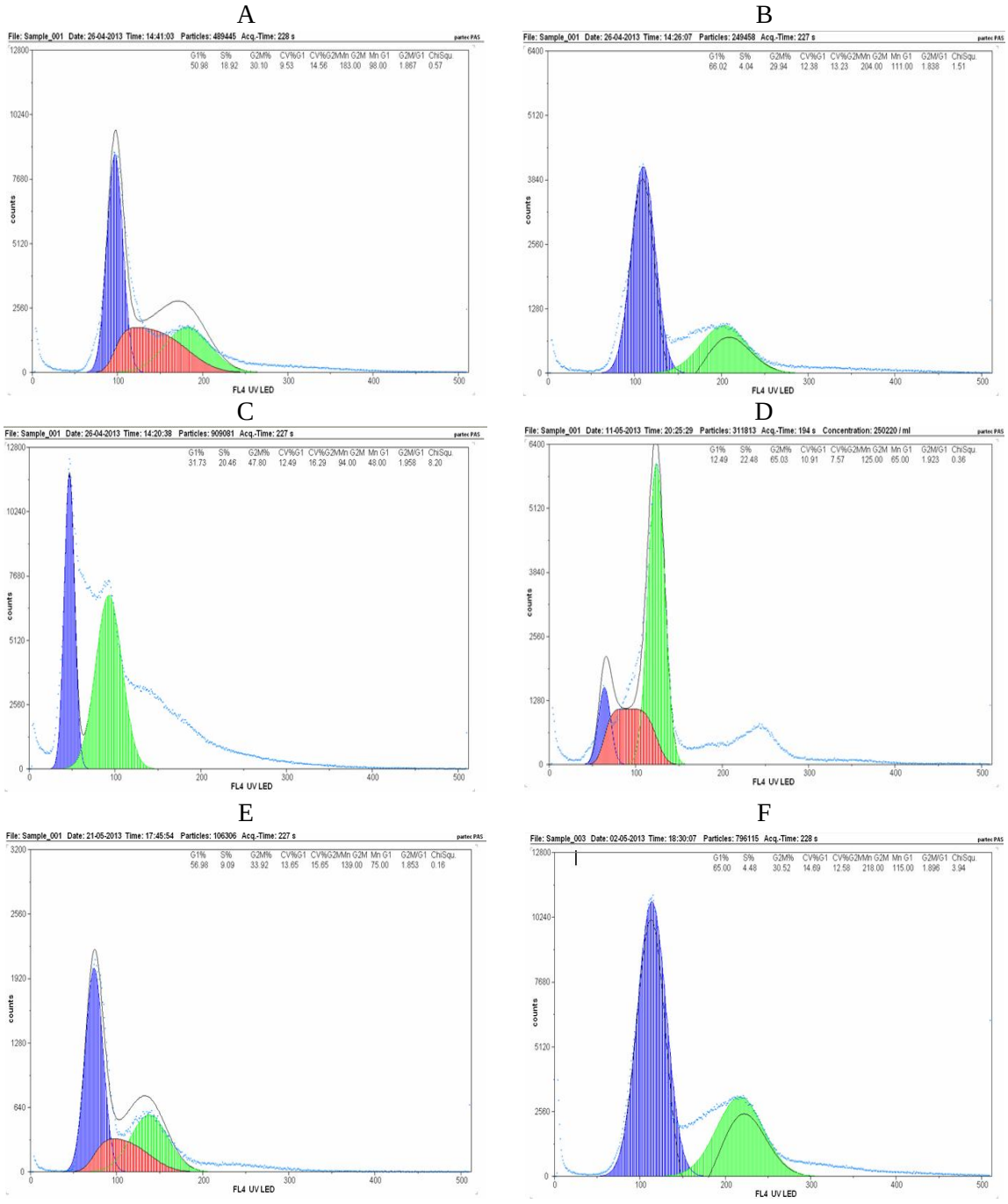
سلولی با استفاده از Partec Flow Max محاسبه گردید (نمودارهای گروه ۱ و ۲) نتایج نشان داد که رتینوئیک اسید به تنهایی باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_0/G_1، سیس پلاتین باعث توقف سلول‌ها در مرحله G_2/M و ۵-فلورواوراسیل باعث توقف سلول‌ها در مرحله G_1/S شد. تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش توقف سلول‌ها G_2/M و تیمارترکیبی‌رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل‌باعث افزایش توقف سلول‌ها در G_1/S شد (جدول ۲، شکل ۱)

جدول ۲: تاثیر تیمار رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل و ترکیب آن‌ها بر روی توزیع درصدی چرخه سلولی، در رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 (نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار برای سه بار تکرار نشان داده شده است).

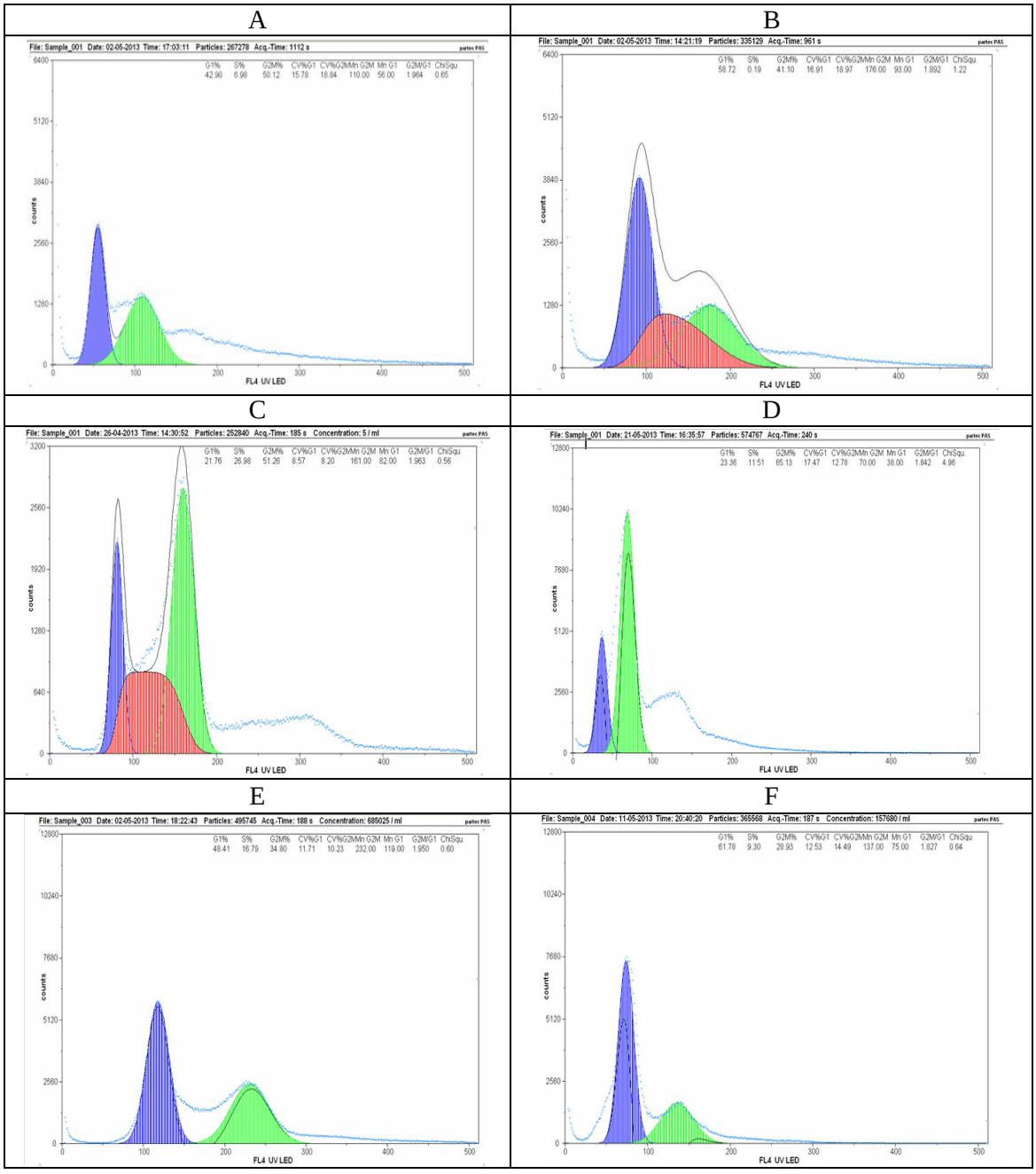
	گروه‌ها	مرحله چرخه سلولی		
		$G0/G_1$	S	G_2/M
AGS	کنترل	۵۱/۰۶±۳/۷	۱۸/۱±۱/۳	۳۰/۹±۲/۴
	رتینوئیک اسید تمام ترانس	۶۴/۸±۳/۸	۴/۶۸±۱/۷	۳۰/۴±۲
	سیس پلاتین	۳۰/۶±۴/۷	۲۰/۴±۲/۲	۴۸/۸±۲/۶
	۵--فلوروراوراسیل	۵۶/۳±۲/۵	۹/۱±۲/۸	۳۴/۴±۵/۳
	رتینوئیک اسید تمام ترانس+ سیس پلاتین	۱۳/۱±۱/۳ [a]	۲۲/۲±۳/۷	۶۴/۶±۴/۹ [a]
	رتینوئیک اسید تمام ترانس+۵-فلورواوراسیل	۶۳/۵±۱/۴۲ [b]	۴/۵±۱/۶	۳۱/۹±۲/۱
KYSE-30	کنترل	۴۲/۷±۳/۱	۶/۵±۱/۵۹	۵۰/۶±۴/۶
	رتینوئیک اسید تمام ترانس	۵۸/۱±۳	۲/۱±۰/۷	۴۰/۹±۳/۳
	سیس پلاتین	۲۲/۱±۲/۸	۲۷±۲/۳	۵۰/۷±۵/۲
	۵--فلورواوراسیل	۴۷/۷±۳/۱	۱۷/۶±۱/۱۵	۳۴/۶±۳/۹
	رتینوئیک اسید تمام ترانس+ سیس پلاتین	۲۲/۷±۲/۵	۱۱/۸±۲/۶	۶۵/۹±۵ [a]
	رتینوئیک اسید تمام ترانس+۵-فلورواوراسیل	۶۰/۸±۲/۷ [b]	۱۰/۵±۱/۳	۲۸/۶±۳/۵

***a:** اختلاف معنی‌دار با گروه سیس پلاتین ($P < ۰/۰۰۱$)*

***b:** اختلاف معنی‌دار با گروه ۵- فلورواوراسیل ($P < ۰/۰۰۱$)*



نمودار گروه ۱: نمودارهای توزیع جمعیتی رده‌ی سلولی AGS در مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی با استفاده از فلوسایتومتری سلول‌های رنگ آمیزی شده با رنگ دپی (درصد جمعیت‌های سلولی بر اساس سطح زیر منحنی محاسبه گردیده است). نمودار خاکستری نشان دهنده‌ی مرحله‌ی S، نمودار مشکی نشان دهنده‌ی مرحله‌ی G_1 و نمودار هاشور نشان دهنده‌ی مرحله‌ی G_2 می‌باشد. نمودار A: گروه کنترل، B: گروه تیمار با رتینوئیک اسید، C: گروه تیمار با سیس پلاتین، D: گروه تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین، E: گروه تیمار با ۵- فلورواوراسیل و F: گروه تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل



نمودار گروه ۲: نمودارهای توزیع جمعیتی رده‌ی سلولی KYSE-30 در مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی با استفاده از فلوسایتومتری سلول‌های رنگ آمیزی شده با رنگ دپی (درصد جمعیت‌های سلولی بر اساس سطح زیر منحنی محاسبه گردیده است). نمودار خاکستری نشان دهنده‌ی مرحله‌ی S ، نمودار مشکی نشان دهنده مرحله‌ی G_1 و نمودار هاشور نشان دهنده‌ی مرحله‌ی G_2 می‌باشد. نمودار A: گروه کنترل، B: گروه تیمار با رتینوئیک اسید، C: گروه تیمار با سیس پلاتین، D: گروه تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین، E: گروه تیمار با ۵- فلورواوراسیل و F: گروه تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل

بحث

سرطان یکی از علل شایع مرگ و میر در جهان است که در حال حاضر مهم‌ترین روش‌های درمان آن شیمی درمانی و جراحی می‌باشد ولی درمان سرطان به دلیل محدویت های انجام آن بسیار مشکل تر از درمان‌های دیگر بیماری‌ها است. مهمترین محدودیت عدم بهبود کامل پس از درمان می‌باشد که اغلب با عود و رشد دوباره‌ی تومور همراه می‌باشد (۱۰). رتینوئیک اسید تمام ترانس یکی از عوامل القا کننده تمایزسلولی می‌باشد که در در مان سرطان پرومیلوسیت Promyelocytic Leukemia برای القا بلوغ سلولی استفاده می‌شود (۱۲ و۱۱). در مطالعه‌ی ما نیز اثرات مهاری رشد سلولی، بعد از شش روز تیمار با رتینوئیک اسید بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 نشان داد رتینوئیک اسید اثرات ضد تکثیری قابل ملاحظه‌ای بر روی سلول‌های سرطانی دارد. لیو و همکارانش با مطالعه‌ی اثرات سمیت رتینوئیک اسید بر روی رده‌های سلولی سرطان معده (MGC-80, BGS-823, SGC-7901) نشان دادند که رتینوئیک اسید با افزایش سطح بیان RAR_{α} موجب اثر مهار رشد و تکثیر بر روی سلول‌های سرطان معده می شود و یک سطح آستانه ای از RAR_a برای عملکرد مهاری رتینوئیک اسید لازم می باشد (۱۳). مطالعات بر روی سرطان مری نشان داده است که از بین گیرنده‌های مختلف رتینوئیدها (RAR_{β} , RAR_{α})، افزایش سطح بیان گیرنده RAR_{β} به وسیله‌ی رتینوئیک اسید باعث اثرات مهاری بر روی رشد سلول‌های سرطان سنگفرشی شده است (۱۴ و۶).

۵- فلوورواوراسیل و سیس پلاتین از جمله داروهای رایج در شیمی درمانی می‌باشند که در درمان سرطان های مختلف استفاده می‌شوند (۱۵). یافته‌های اخیر نشان دهنده‌ی اثرات افزایشی رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی داروهای شیمی درمانی در برخی از سرطان‌ها می‌باشد. نتایج ما نیز در این مطالعه نشان داد که استفاده از تیمار ترکیبی با غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید باعث کاهش قابل ملاحظه‌ی مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل شد. که با کاهش قابل ملاحظه‌ی IC_{50} داروها همراه بود. زین لی و همکارانش (۲۰۰۸) با بررسی اثرات رتینوئیدهای مختلف در حضور داروهای سیس پلاتین و ۵- فلورواوراسیل در تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی بر روی رده ی سلولی B16-F10 ملانومای موش در شرایط داخل و خارج از بدن موجود زنده نشان دادند که تیمار اولیه با رتینوئیک اسید قبل از تجویز سیس پلاتین باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به سیس پلاتین شد ولی تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با ۵- فلورواوراسیل اثر افزایشی سمیتی را نشان نداد. در شرایط داخل بدن تعداد کلونی‌های متاستاتیک ناشی از رده‌ی سلولی B16-F10 در ریه‌ی موش در اثر تجویز رتینوئیک اسید به مدت ۱۰ روز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته بود، نتایج آنها نشان داد ترکیب درمان سیس پلاتین و رتینوئیک اسید سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در اندازه و تعداد تومورها در ریه‌ی موش شده است (۹). زهره دلیرثانی و همکارانش با بررسی اثرات ۵-فلورواوراسیل در ترکیب با ۱۳-سیس رتینوئیک اسید و ویتامین D_3 بر روی رده‌ی سلولی سرطان سنگفرشی دهان با روش تعیین فعالیت متابولیکی و Terminal Dexynucleptidyl Transferase dUTP Nick End Labeling(TUNEL) نشان دادند ترکیب ۵-فلورواوراسیل و ۱۳- سیس رتینوئیک اسید اثرات مهار بیشتری را بر روی تکثیر سلول‌های سرطان سنگفرشی دهان داشت که ممکن ناشی از اثرات افزایشی رتینوئیک اسید بر روی ۵-فلورواوراسیل در سرطان سلول سنگفرشی دهان باشد (۱۶). شین هانگ هنگ و همکارانش با مطالعه بر روی رده‌های سلولی سرطان حلق بینی (۲۰۱۳) نشان دادند استفاده تنها از رقت‌های پایین رتینوئیک اسید باعث اثرات هم افزایی در ترکیب با سیس پلاتین می‌شود (۱۷). اخیرا بعضی از تومورها نسبت به داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل

مقاومت نشان می‌دهند که یکی از علت‌های اصلی آن می‌تواند ناشی از افزایش بیان پروتئین Bcl-2 (پروتئین ضد آپوپتوز) باشد. رده سلولی AGS نسبت به مهار رشد سلولی رتینوئیک اسید حساسیت بیشتری نشان داد لذا آزمایش رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید بر روی این رده‌ی سلولی انجام شد. بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها با رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ترکیب تیمار رتینوئیک اسید با داروها سبب افزایش سلول‌های آپوپتوز اولیه و آپوپتوز تاخیری نسبت به استفاده‌ی تنها از داروها شد. مطالعات مشابه نیز نشان دهنده‌ی اثرات رتینوئیک اسید بر افزایش اثرات سمیتی سیتارابین در سلول‌های بنیادی سرطان گلبول‌های سفید و بر روی سیس پلاتین در القا آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطان سر و گردن شده است (۱۹و ۱۸).

مطالعات نشان داده است که رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل می‌توانند موجب اختلال در چرخه‌ی سلولی (۲۰) و توقف آن در فازهای G_0/G_1 (۱۲) و G_2/M (۲۱) و G_1/S (۲۲) شود. مطالعات در این زمینه با تیمار ترکیبی بسیار محدود می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر شاید جزء معدود مطالعات از این نوع باشد. مطالعه‌ی ما بر روی رده‌های AGS و KYSE-30 و تیمار آنها به تنهایی با داروهای رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل موید گزارشات قبلی است. یافته‌های ما در تیمار ترکیبی نشان می‌دهد که توقف سلول‌ها در چرخه‌ی سلولی به نوع سلول (حداقل در مورد AGS و KYSE-30) بستگی ندارد ولی وابسته به نوع دارو می‌باشد به طوری که بیشترین توقف در تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین در فاز G_2/M بوده و در تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل در فازG_1/S است. می‌توان نتیجه گرفت که تیمار ترکیبی موجب تغییر فاز توقفی نمی‌شود اما درصد سلول‌های متوقف شده را افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

بررسی ما نشان داد که تیمار ترکیبی غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل موجب افزایش اثرات سمیتی این داروها و حساس‌تر کردن رده‌های سلولی سرطان مری و معده نسبت به آپوپتوز و مهار چرخه ی سلولی می‌شود. بنابراین تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل می‌تواند به عنوان پیشنهاد، در درمان سرطان‌های مری و معده مطرح شود که البته مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره‌ی ۰۵ می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از آقای دکتر شهاب بهلولی دکترای داروسازی به خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه قدردانی نمایند.

References

1- Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD_{44}. *Stem Cells*. 2009; 27: 1006-20.

2- Enzinger P, Mayer R. Esophageal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2241-52.

3- Mohamadkhani A, Darvish Moghaddam S, Salmanroghani H, et al. Are the serum biomarkers pepsinogen I and II good predictors for the detection of subjects with atrophic gastritis in

areas that have different gastric cancer incidence? *Arch Iran Med*. 2013; 16: 208-12.
4- Ho YP, AuYeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev*. 2003; 23: 633-55.
5- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis. *Mol Pharmacol*. 2001; 59: 657-63.
6- Shimizu M, Suzui M, Deguchi A, Lim JT, Weinstein IB. Effects of acyclic retinoid on growth, cell cycle control, epidermal growth factor receptor signaling, and gene expression in human squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 1130-40.
7- Sacks PG, Harris D, Chou TC. Modulation of growth and proliferation in squamous cell carcinoma by retinoic acid: a rationale for combination therapy with chemotherapeutic agents. *Int J Cancer*. 1995; 61: 409-15.
8- Petersson F, Colston K, Dalgleish A. Retinoic acid enhancest the cytotoxic effects of gemcitabine and cisplatin in pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas*. 2001; 23: 273-9.
9- Liu X, Chan SY, Ho PC. Comparison of the in vitro and in vivo effects of retinoids either alone or in combination with cisplatin and 5-fluorouracil on tumor development and metastasis of melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008; 63: 167-74.
10- Nguyen GH, Murph MM, Chang JY. Cancer stem cell radioresistance and enrichment: where frontline radiation therapy may fail in lung and esophageal cancers. *Cancers (Basel)*. 2011; 3: 1232-52.
11- Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr*. 2004; 24: 201-21.
12- Dimberg A, Oberg F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44: 1641-50.
13- Liu S, Wu Q, Chen ZM, Su WJ. The effect pathway of retinoic acid through regulation of retinoic acid receptor alpha in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2001; 7: 662-6 .
14- Lotan R, Xu XC, Lippman SM, et al. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med*. 1995; 332: 1505-10.
15- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407: 770-6.
16- Dalirsani Z, Farajnia S, Javadzadeh Y, Mehdipour M, Koozegari S. The Effects of 5-fluorouracil alone and in combination with 13-cis retinoic asid and vitamin D3 on human oral squamous cell carcinoma lines. *J Contemp Dent Practice*. 2012; 13: 345-50.
17- Hung S, Lee F, Su C, Tseng H. Effect of all-trans retinoic acid on the growth of two nasopharyngeal cancer cell lines and its treatment potential in combination with cisplatin. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012; 4: 695-704.
18- Aebi S, Kroning R, Cenni B, et al. All-trans

retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 2033-8.

19- Hu l, Minden M, McCulloch E. Direct evidence for the participation of bcl-2 in the regulation by retinoic acid of the Ara-C sensitivity of leukemic stem cells. *Leukemia*. 1995; 9: 1667-73.

20- Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. Cell Cycle. 2002; 1: 103-10.

21- Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82: 749-55.

22- Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, et al. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res*. 2001; 61: 1029-37.

All-Trans Retinoic Acid Combination with Cisplatin and 5-Fluorouracil Enhance Cytotoxic Effect on AGS and KYSE-30 Cell Lines

Abbasi A[1], Amani A[2], Najafzadeh N[3], Yalameha Y[4], Mazani M[1], Fakour S[5]

[1]Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

[2]Dept. of Biophysics, Fcultyl of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

[3]Dept. of Anatomy & Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

[4]Dept. of Nursing, Faculty of Nursing & Midwifery, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

[5]Dept. of Anesthesiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

Corresponding Author: Najafzadeh N, Dept of Anatomy & Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

E-mail: n.najafzade@arums.ac.ir

Received: 27 Feb 2014 **Accepted:** 25 Sep 2014

Background and Objective: All-trans retinoic acid (ATRA), a derivative of vitamin A, exerts fundamental effects on regulation of cell growth, differentiation and apoptosis. Recent studies have shown an increase in resistance of gastric adenocarcinoma and squamous cell carcinoma to cisplatin and 5-fluorouracil. In this study, we investigated a combination treatment of ATRA with cisplatin and 5-fluorouracil on gastric (AGS) and esophageal (KYSE-30) cancer cell lines.

Materials and Methods: KYSE-30 and AGS cell lines were cultured in RPMT-1640, including sub-toxic concentration of ATRA (13.6 and 3.6µM respectively) for 6 days and then they were treated with cisplatin and 5-fluorouracil for 72h. The effects of combination treatment were tested by MTT assay, ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining and flow cytometry.

***Results*:** Determination of IC_{50} (Inhibitory concentration of 50%) with MTT assay showed that combination treatment had cytotoxic effect on both cell lines. IC50 value of the combined drugs was lower than the IC_{50} of drugs alone ($p<0/05$). The percentage of apoptotic cells increased in comparison to drugs alone in EB/AO staining ($p<0/05$). Furthermore, there was an indication that the combination of ATRA with cisplatin caused increased cell cycle arrest at G_2/M in AGS and KYSE-30 cells. Also, ATRA and 5FU induced enhanced cell cycle arrest at G_1/S phase in KYSE-30 and AGS cells ($p<0/001$).

Conclusion: Our findings demonstrate that sub-toxic concentration of combination treatment of ATRA with cisplatin and 5-fluorouracil induces further cytotoxic effects on KYSE-30 and AGS cancer cell lines.

Keywords*: All-trans-retinoic acid, Cisplatin, 5-Fluorouracil, KYSE-30 cell line, AGS cell line*