

افزایش اثرات درمانی سیس پلاتین و 5-فلورووراسیل 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 مازنی^۵، سینا فکور^۶

نویسنده‌ی مسول: اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده‌ی پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی n.najfzade@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 آپوپتوز دارد. مطالعات اخیر نشان دهنده‌ی افزایش مقاومت سلول‌های آدنوکارسینوما‌ی معده و کارسینوم سلول‌های سنگفرشی مری نسبت به داروهای شیمی درمانی سیس پلاتین و 5-فلورووراسیل می‌باشد. لذا در این مطالعه اثرات سمیتی تیمار ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس با داروهای سیس پلاتین و 5-فلورووراسیل بر روی رده‌های سلولی سرطان مری و معده بررسی شد.

روش بررسی: رده‌های سلولی آدنوکارسینوم معده (AGS) و کارسینوم سلول سنگفرشی مری (KYSE-30) به مدت شش روز در محیط کشت RPMI-1640 حاوی غلظت‌های زیر سمیت (به ترتیب ۳/۶ و ۱۳/۶ میکرومول) رتینوئیک اسید کشت داده شدند و پس از ۷۲ ساعت تحت تیمار با داروهای سیس پلاتین و 5-فلورووراسیل قرار گرفتند. اثرات تیمار ترکیبی با روش‌های تعیین فعالیت متابولیکی، رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ 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. ($P < 0/001$, $P < 0/05$) رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید نشان دهنده افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز در گروه تیمار ترکیبی نسبت به استفاده تنها از داروها بود. ($P < 0/001$, $P < 0/05$) علاوه بر آن، تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش توقف سلول‌ها در فاز G_2/M و تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با 5-فلورووراسیل باعث افزایش توقف در فاز G_1/S شد ($P < 0/001$)
نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد تیمار ترکیبی غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید با داروهای سیس پلاتین و 5-فلورووراسیل موجب افزایش اثرات سمیتی این داروها بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30 می‌شود.

واژگان کلیدی: رتینوئیک اسید تمام ترانس، سیس پلاتین، 5-فلورووراسیل، رده سلولی AGS رده سلولی KYSE-30

مقدمه

سرطان‌های دستگاه گوارش از جمله سرطان‌های شایع در جهان به‌شمار می‌روند. سرطان معده چهارمین سرطان شایع و دومین علت منجر به مرگ ناشی از سرطان‌ها می‌باشد. همچنین سرطان مری هشتمین سرطان شایع و ششمین علت

- 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

بر آن شدیم تا اثرات تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل بر روی رده‌های سلولی آدنوکارسینوما 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 (CO₂ ۵ درصد) نگهداری شد.

داروها: سیس پلاتین (Sigma-Germany) با دوز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت محلول آماده‌ی تزریق داخل وریدی تهیه شد. ۵-فلورووراسیل (Sigma-Germany) یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌صورت پودر در محلول Phosphate Buffer Saline (PBS) حل شد. رتینوئیک اسید تمام ترانس (Sigma-Germany) در محلول دی‌متیل سولفواکساید حل شد و غلظت‌های مختلف آن تا قبل از استفاده در یخچال نیتروژن 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 (IC₅₀) تعیین گردد. ۴ ساعت قبل از اتمام دوره‌ی تیمار، محیط رویی سلول را خارج

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 (۱ و ۲). استان اردبیل در حال 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-فلورووراسیل از جمله داروهای مرسوم شیمی‌درمانی به‌شمار می‌روند. سیس پلاتین از طریق القای آسیب وسیع در سطح DNA (۵) و ۵-فلورووراسیل 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 اپی‌تلیالی طبیعی و سرطانی نقش دارند که اخیراً استفاده از رتینوئیدها 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-فلورووراسیل باعث افزایش سمیت این داروها بر روی سرطان سلول سنگفرشی ملانوما (۷) و رده‌ی سلولی آدنوکارسینوما پانکراس می‌گردد (۸). لذا در مطالعه‌ی حاضر

که در آن ۳ نوع تغییر مورفولوژیکی را می‌توان مشاهده کرد که عبارتند از: 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 آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه و نکروتیک شمارش گردید.

چرخه‌ی سلولی: برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها جهت فلوسایتومتری محلول حاوی یک میلی‌گرم رنگ دپی در ۵۰ سی سی سی PBS تهیه شد. تعداد 5×10^5 سلول در هر خانه از پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد. سپس سلول طبق برنامه‌ی تیمار که قبلاً ذکر شد، تیمار گردید. پس اتمام دوره‌ی تیمار، سلول‌ها با PBS شستشو و توسط ۳ سی سی الکل ۷۰ درصد تثبیت شدند و به مدت یک ساعت در یخچال چهار درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۷ سی سی PBS به سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۷۰۰ rpm (دور بر دقیقه) سانتریفوژ و یک سی سی محلول دپی (DAPI) 4',6-Diamidino-2-Phenylindole 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 $P < 0.05$ و $P < 0.001$ در نظر گرفته شد. تمام مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

یافته‌ها

تعیین فعالیت متابولیکی: مطابق جدول ۱، ارزیابی

و ۱۸۰ لاندا محیط تازه‌ی عاری از سرم به همراه ۲۰ لاندا رنگ MTT [3-[4, 5 Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide] 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 به ترتیب 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 از پلیت 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 به مدت شش روز با رتینوئیک اسید و به مدت 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 فلورئوسنت (Olympus) تصاویری تهیه شد

داشته و تیمار ترکیبی با رتینوئیک اسید باعث کاهش قابل ملاحظه‌ی سلول‌ها نسبت به استفاده‌ی تنها از داروها گردید.

IC₅₀ با روش تعیین فعالیت متابولیکی نشان داد که رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورورواسیل خاصیت مهاری بر تکثیر سلولی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30

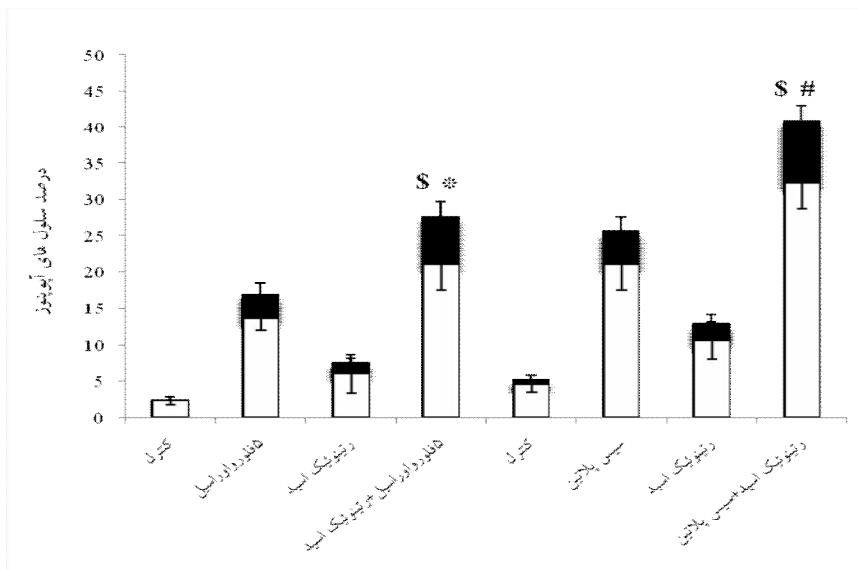
جدول ۱: مقادیر IC₅₀ رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورورواسیل و ترکیب آن‌ها بر روی رده‌های سلولی AGS و KYSE-30. (مقادیر نشان داده شده بر اساس میانگین \pm انحراف معیار برای سه بار تکرار می‌باشد)

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-فلورورواسیل	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-فلورورواسیل	۰/۸±۰/۱ ^b	۰/۷۲±۰/۱۶ ^b

اختلاف معنی‌دار با گروه سیس پلاتین ($P < ۰/۰۰۱$)
 اختلاف معنی‌دار با گروه ۵-فلورورواسیل ($P < ۰/۰۵$)

استفاده تنها از داروها شد (نمودار ۱) درصد سلول‌های AGS آپوتوز در تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین نسبت به تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورورواسیل بیشتر بود.

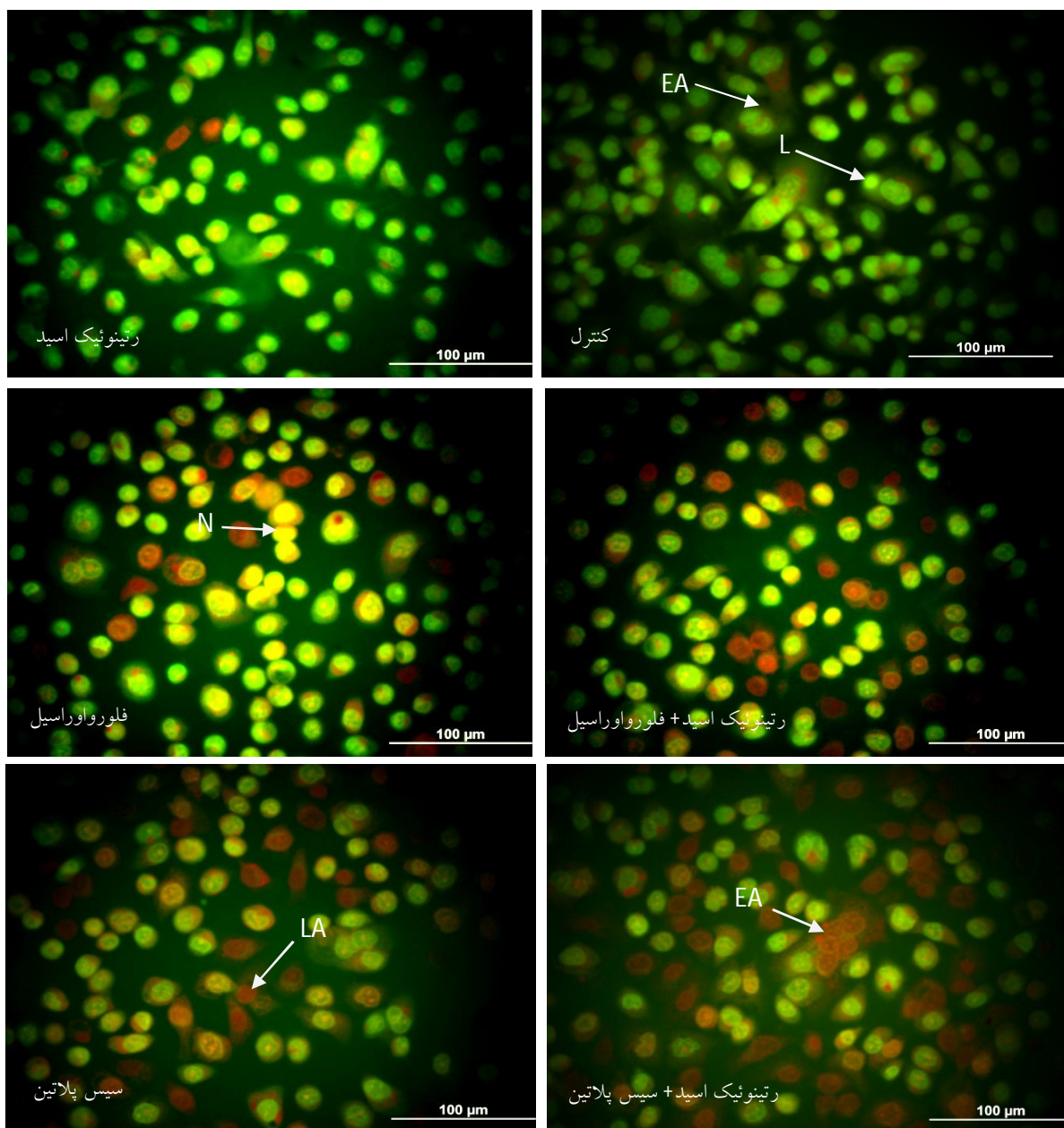
بررسی مرگ سلولی: اثرات القایی آپوتوز رتینوئیک اسید، سیس پلاتین و ۵-فلورورواسیل و تیمار ترکیبی آنها بر روی رده‌ی سلولی AGS نشان داد که تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با داروها منجر به افزایش درصد سلول‌های آپوتوز نسبت به



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

□ نشان دهنده‌ی آپوتوز اولیه ■ نشان دهنده‌ی آپوتوز ثانویه

اختلاف معنی‌دار با گروه ۵-فلورورواسیل ($P < ۰/۰۰۱$) # 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 و تیمار 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

ترکیبی آن‌ها به وسیله آنالیز چرخه‌ی سلولی با فلوسایتومتری انجام شد. درصد سلول‌ها در مراحل G_1 ، S و G_2 چرخه

بررسی چرخه سلولی به وسیله فلوسایتومتری: اثرات تیمار با رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورواوراسیل و تیمار

باعث توقف سلول‌ها در مرحله G_1/S شد. تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش توقف سلول‌ها G_2/M و تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با ۵-فلورواوراسیل باعث افزایش توقف سلول‌ها در G_1/S شد (جدول ۲، شکل ۱)

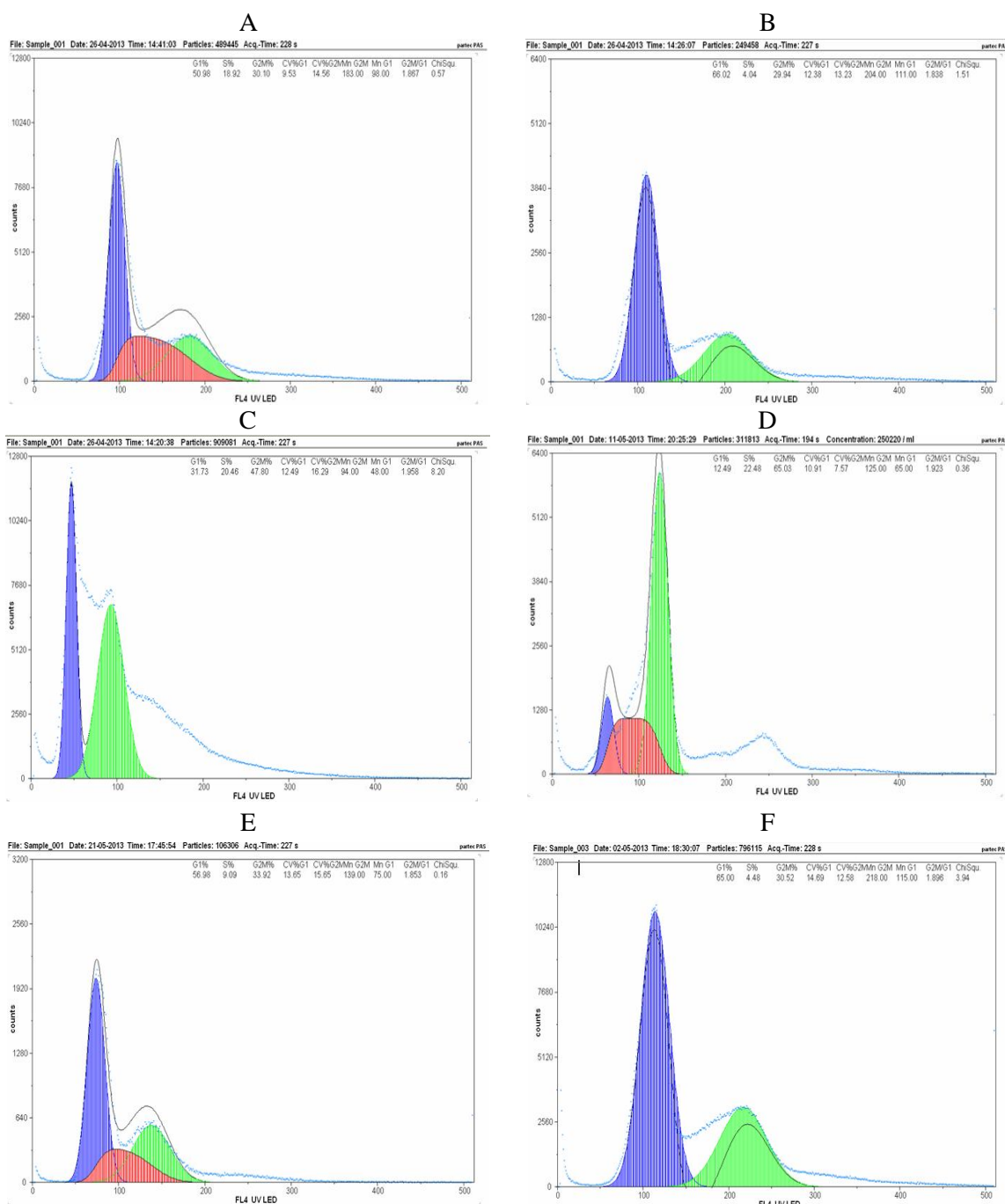
سلولی با استفاده از Partec Flow Max محاسبه گردید (نمودارهای گروه ۱ و ۲) نتایج نشان داد که رتینوئیک اسید به تنهایی باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_0/G_1 ، سیس پلاتین باعث توقف سلول‌ها در مرحله G_2/M و ۵-فلورواوراسیل

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 \pm انحراف معیار برای سه بار تکرار نشان داده شده است).

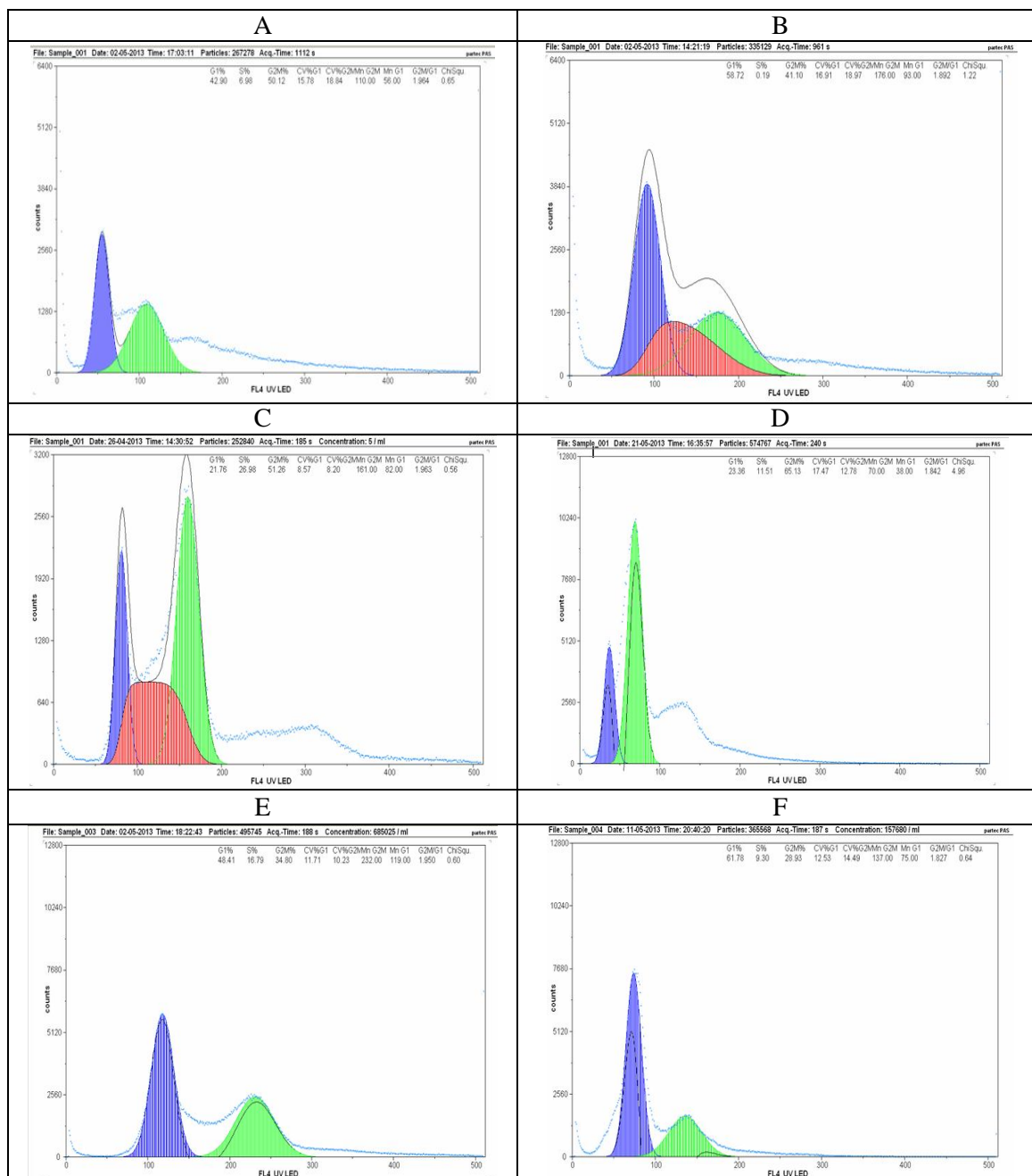
مرحله چرخه سلولی			گروه‌ها	
G_2/M	S	G_0/G_1		
۳۰/۹±۲/۴	۱۸/۱±۱/۳	۵۱/۰۶±۳/۷	کنترل	
۳۰/۴±۲	۴/۶۸±۱/۷	۶۴/۸±۳/۸	رتینوئیک اسید تمام ترانس	
۴۸/۸±۲/۶	۲۰/۴±۲/۲	۳۰/۶±۴/۷	سیس پلاتین	
۳۴/۴±۵/۳	۹/۱±۲/۸	۵۶/۳±۲/۵	۵-فلورواوراسیل	AGS
۶۴/۶±۴/۹ ^a	۲۲/۲±۳/۷	۱۳/۱±۱/۳ ^a	رتینوئیک اسید تمام ترانس + سیس پلاتین	
۳۱/۹±۲/۱	۴/۵±۱/۶	۶۳/۵±۱/۴۲ ^b	رتینوئیک اسید تمام ترانس + ۵-فلورواوراسیل	
۵۰/۶±۴/۶	۶/۵±۱/۵۹	۴۲/۷±۳/۱	کنترل	
۴۰/۹±۳/۳	۲/۱±۰/۷	۵۸/۱±۳	رتینوئیک اسید تمام ترانس	
۵۰/۷±۵/۲	۲۷±۲/۳	۲۲/۱±۲/۸	سیس پلاتین	
۳۴/۶±۳/۹	۱۷/۶±۱/۱۵	۴۷/۷±۳/۱	۵-فلورواوراسیل	KYSE-30
۶۵/۹±۵ ^a	۱۱/۸±۲/۶	۲۲/۷±۲/۵	رتینوئیک اسید تمام ترانس + سیس پلاتین	
۲۸/۶±۳/۵	۱۰/۵±۱/۳	۶۰/۸±۲/۷ ^b	رتینوئیک اسید تمام ترانس + ۵-فلورواوراسیل	

a: اختلاف معنی‌دار با گروه سیس پلاتین ($P < 0/001$)

b: اختلاف معنی‌دار با گروه ۵-فلورواوراسیل ($P < 0/001$)



نمودار گروه ۱: نمودارهای توزیع جمعیتی رده‌ی سلولی AGS در مراحل مختلف چرخه‌ی سلولی با استفاده از فلوسایتومتری سلول‌های رنگ آمیزی شده با رنگ دی‌بی (درصد جمعیت‌های سلولی بر اساس سطح زیر منحنی محاسبه گردیده است). نمودار خاکستری نشان دهنده‌ی مرحله‌ی S که 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 دی‌بی (درصد جمعیت‌های سلولی بر اساس سطح زیر منحنی محاسبه گردیده است). نمودار خاکستری نشان دهنده‌ی مرحله‌ی S، نمودار مشکی نشان دهنده‌ی مرحله‌ی G₁ و نمودار هاشور نشان دهنده‌ی مرحله‌ی G₂ می‌باشد. نمودار A: گروه کنترل، B: گروه تیمار با ریتینوئیک اسید، C: گروه تیمار با سیس پلاتین، D: گروه تیمار ترکیبی ریتینوئیک اسید با سیس پلاتین، E: گروه تیمار با ۵-فلوروراسیل و F: گروه تیمار ترکیبی ریتینوئیک اسید با ۵-فلوروراسیل

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 محدودیت‌های انجام آن بسیار مشکل‌تر 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 تمایز سلولی می‌باشد که در در مان سرطان پرومیلوسیت Promyelocytic Leukemia برای القا بلوغ سلولی استفاده می‌شود (۱۲ و ۱۱). 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 تکثیر 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 می‌شود و یک سطح آستانه‌ای از RAR_{α} برای عملکرد مهاری رتینوئیک اسید لازم می‌باشد (۱۳). مطالعات بر روی سرطان مری نشان داده است که از بین گیرنده‌های مختلف رتینوئیدها (RAR_{α} , RAR_{β})، افزایش سطح بیان گیرنده RAR_{β} به وسیله‌ی رتینوئیک اسید باعث اثرات مهاری بر روی رشد سلول‌های سرطان سنگفرشی شده است (۱۴ و ۶).

۵- فلورووراسیل و سیس پلاتین از جمله داروهای رایج در شیمی درمانی می‌باشند که در درمان سرطان‌های 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-فلورووراسیل 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- فلورووراسیل در تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی بر روی رده‌ی 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- فلورووراسیل 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-فلورووراسیل 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 Dextranucleotidyl Transferase و dUTP Nick End Labeling (TUNEL) نشان دادند ترکیب ۵-فلورووراسیل 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-فلورووراسیل 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 افزایشی در ترکیب با سیس پلاتین می‌شود (۱۷). اخیراً بعضی از تومورها نسبت به داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل

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 آکریدین 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 گلوبول‌های سفید و بر روی سیس پلاتین در القا آپوپتوز در رده‌ی سلولی سرطان سر و گردن شده است (۱۸ و ۱۹).

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 محدود 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

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 چرخه‌ی 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 به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه‌ی 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 CD44. *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 enhances 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 acid 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 1, 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 A¹, Amani A², Najafzadeh N³, Yalameha Y⁴, Mazani M¹, Fakour S⁵

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

²Dept. of Biophysics, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences & Health Services, Ardabil, Iran.

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

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

⁵Dept. 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 RPMI-1640, including sub-toxic concentration of ATRA (13.6 and 3.6 μ M 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 IC₅₀ (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 IC₅₀ 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 G₂/M in AGS and KYSE-30 cells. Also, ATRA and 5FU induced enhanced cell cycle arrest at G₁/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