

افزایش سمیت داروهای شیمی درمانی با رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی سلول‌های CD44

اسدالله عباسی (MSc)^۱، محمد مآذنی (PhD)^{۲*}، نوروز نجف زاده (PhD)^۳، مجتبی امانی (PhD)^۴، حمید شیخ کاندلی میلان (PhD)^۴

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

۲- گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

۳- گروه بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

۴- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان

دریافت: ۹۳/۱۱/۱۵، اصلاح: ۹۴/۹/۱۵، پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۵

خلاصه

سابقه و هدف: در مطالعات اخیر علت مقاومت تومور مری به داروهای شیمی درمانی، وجود سلول‌های CD44 تمایز نیافته بیان شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تمایزگری "رتینوئیک اسید تمام ترانس" برای کاهش مقاومت تومورها به شیمی درمانی و همچنین بهبود اثر سمیتی آنها می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی سلول‌های CD44⁺ و CD44⁻ با روش MACS از رده سلولی KYSE-30 جدا گردید. اثرات سمیتی تیمار رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و رتینوئیک اسید با ۵-فلورووراسیل به طور مجزا بر روی دو گروه سلولی CD44⁺ و CD44⁻ بررسی و سمیت سلولی با استفاده از روش تعیین فعالیت متابولیکی، رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید و فلوسایتومتری تعیین گردید.

یافته‌ها: شناساگر CD44 در ۶/۲۵ درصد از جمعیت رده سلولی KYSE-30 بیان شده بود. یافته‌های حاصل از روش فلوسایتومتری نشان داد که تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با داروها باعث افزایش توقف سیکل سلولی در سلول‌های CD44⁺ شد ($p < 0.05$) اما در سلول‌های CD44⁻ چنین اثری را نشان نداد. روش تعیین فعالیت متابولیکی افزایش مرگ میر سلولی به همراه کاهش IC₅₀ و رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید افزایش درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول‌های CD44⁺ نشان داد اما در سلول‌های CD44⁻ این اثرات فقط در ترکیب رتینوئیک اسید با سیس پلاتین مشاهده شد. ($p < 0.05$)

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که رتینوئیک اسید تمام ترانس، باعث افزایش سمیت داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل بر روی سلول‌های CD44⁺ گردید.

واژه‌های کلیدی: رده سلولی KYSE-30، رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵-فلورووراسیل، CD44، شیمی درمانی.

مقدمه

تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی بر روی رده سلولی B16-F10 ملانومای موش در شرایط داخل و خارج از بدن موجود زنده پرداختند و نتایج آنها نشان داد که درمان با رتینوئیک اسید، قبل از تجویز سیس پلاتین باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی نسبت به سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل شد. در شرایط داخل بدن تعداد کلونی‌های متاستاتیک ناشی از رده سلولی B16-F10 در ریه 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 ریه موش شد (۷). hung و همکارانش که اثرات ترکیب تیمار رتینوئیک اسید تمام ترانس با سیس پلاتین را بر روی دو رده سلولی سرطان حلق-بینی (NPC-TW01, NPC-)

سرطان مری هشتمین سرطان شایع در دنیا و ششمین علت متجر به مرگ ناشی از سرطان‌ها می باشد. از عوامل موثر در بروز این سرطان می توان به مصرف دخانیات، الکل و بیماری بارتز اشاره کرد. (۱ و ۲) اخیرا علت عود و رشد مجدد تومورهای سرطانی را وجود سلول‌های بنیادی سرطان در داخل تومورها مطرح کرده اند که نسبت به عوامل شیمی درمانی مقاومت قابل ملاحظه‌ای نشان می دهند (۳ و ۴). مطالعات اخیر نشان می دهد که رتینوئیک اسید اثرات ضد تکثیری بر روی برخی از سلول‌های بنیادی سرطانی دارد (۵) که همراه با کاهش بیان شناساگرهای سطح سلولی، سلول‌های بنیادی سرطان و در نتیجه کاهش قدرت تهاجم آنها بوده است (۶). Liu و همکارانش در مطالعه‌ای به بررسی اثرات رتینوئیک‌های مختلف در حضور داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل در

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد اسدالله عباسی دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمد مآذنی

E-mail: m.mazani@arums.ac.ir

آدرس: اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی. تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۰۵۲

گروه‌های تیمار: سلول‌های رده KYSE-30 با استفاده از روش MACS به دو گروه $CD44^+$ و $CD44^-$ تقسیم شد سپس هر گروه به طور جداگانه به چهار زیر گروه تقسیم و به ترتیب درمان‌های (۱) تیمار با سیس پلاتین به مدت ۷۲ ساعت (۲) تیمار با ۵-فلورواوراسیل به مدت ۷۲ ساعت (۳) تیمار اولیه با رتینوتیک اسید به مدت شش روز سپس تیمار با سیس پلاتین به مدت ۷۲ ساعت و (۴) تیمار اولیه با رتینوتیک اسید به مدت شش روز سپس تیمار با ۵-فلورواوراسیل به مدت ۷۲ ساعت را دریافت نمودند.

تعیین غلظت زیر سمیت رتینوتیک اسید: برای تعیین غلظت‌های زیر سمیت رتینوتیک اسید، مطالعه تیمار با غلظت‌های مختلف رتینوتیک اسید (۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲) به مدت ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های $CD44^-$ و $CD44^+$ در پلیت‌های ۹۶ خانه انجام گرفت تا غلظتی که موجب مهار ۵۰ درصد فعالیت متابولیکی می‌شود، تعیین گردد. ۴ ساعت قبل از اتمام دوره تیمار محیط روئی سلول را خارج و ۱۸۰ ناندا محیط تازه عاری از سرم به همراه ۲۰ ناندا رنگ MTT ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر چاهک‌ها اضافه شد. پلیت دوباره انکوبه و سپس محیط آن را خارج و ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفات به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد در نهایت جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر قرائت شد. این آزمایشات سه بار تکرار گردید و میانگین سه بار تکرار آزمایشات به صورت IC₅₀ (غلظتی که موجب کاهش ۵۰ درصد فعالیت می‌شود) بدست آمد. در نهایت غلظت‌های زیر سمیت ۵/۴ و ۱۳ رتینوتیک اسید به ترتیب برای تیمار ترکیبی با داروها در سلول‌های $CD44^-$ و $CD44^+$ مورد استفاده قرار گرفت.

ترکیب درمانی: سلول‌های $CD44^-$ و $CD44^+$ به مدت شش روز در حضور و عدم حضور غلظت‌های زیر سمیت رتینوتیک اسید (۵/۴ و ۱۳) کشت داده شدند. سلول‌ها با PBS (Phosphat Buffer Saline) یک بار شستشو داده و با تریپسین EDTA از کف فلاسک جدا و با لام نوبار سلول‌ها شمارش شد. تعداد ۱۰ هزار عدد سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر 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 میلی لیتر از غلظت‌های مختلف سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶) جایگزین شده و به مدت ۷۲ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه یافت (۷). آزمایشات در پلیت‌های ۹۶ خانه ای سه بار تکرار گردید و در نهایت میانگین سه بار تکرار آزمایشات گزارش گردید.

رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیديوم بروماید (Acridine Bromide Orange/Ethidium): برای آپوپتوز: تعداد ۱۲ هزار سلول در هر پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد (با سه بار تکرار) و سپس طبق برنامه تیماری (شش روز با رتینوتیک اسید و ۷۲ ساعت با سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل) تیمار گردیدند. پس از اتمام دوره تیمار نیم میلی لیتر محلول ۱۰۰ میکروگرم آکریدین اورنج/ اتیديوم بروماید به هر چاهک اضافه شد. پنج دقیقه بعد با میکروسکوپ فلوروسنت مدل المپوس تصاویری تهیه شد. در تصاویر ۳ نوع تغییر مورفولوژیکی را می‌توان مشاهده کرد:

(الف) سلول‌های آپوپتوز اولیه، که هسته آنها متراکم و قطعه قطعه شده بود
(ب) سلول‌های آپوپتوز تاخیری با هسته متراکم قرمز فلوروسنت و قطعه قطعه شده.
(ج) سلول‌های نکروتیک به رنگ زرد متمایل به قرمز و یک دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته که همگی از سلول‌های سالم با رنگ سبز پررنگ قابل

بررسی کردند ارزیابی مورفولوژی بعد از تیمار با غلظت‌های پایین رتینوتیک اسید نشان دهنده افزایش تعداد سلول معلق و کاهش سلول‌های متصل در هر دو رده سلولی بود (باعث مرگ سلول‌ها شده بود) سلول‌ها حالت مسطح و پهن به خود گرفته بودند (تمایز یافته بودند) و تحت تاثیر غلظت‌های پایین رتینوتیک اسید رشد سلولی در هر دو رده سلولی به طور قابل ملاحظه ای مهار کاهش یافته بود. استفاده ترکیب تیمار رتینوتیک اسید با سیس پلاتین حاکی از اثرات هم افزایی ترکیب تیمار بود استفاده تنها از رقت‌های پایین رتینوتیک اسید باعث اثرات هم افزایی در ترکیب با سیس پلاتین شده بود (۸). مهمترین شناساگری که در سطح سلول‌های بنیادی مری بیان می‌شود شناساگر $CD44$ است (۹).

نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی نشان داده است که رتینوتیک اسید تمام ترانس می‌تواند باعث القای تمایز در سلول‌های بنیادی سرطانی $CD44^+$ به سلول‌های $CD44^-$ شده و به‌طور قابل توجهی بیان mRNA شناساگر $CD44^+$ را کاهش و تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی را مهار کند (۵). سلول‌های $CD44^-$ نسبت به سلول‌های $CD44^+$ مقاومت بیشتری نسبت به عوامل شیمی درمانی رایج از جمله سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل دارند و سبب عود و رشد مجدد تومورها می‌گردند (۵). بنابراین انتخاب داروهایی که هدف آنها سلول‌های سرطانی $CD44^+$ باشد ممکن است باعث معالجه سرطان بدون نیاز به جراحی و برداشت بافت باشد. لذا با توجه به اثر تمایزگری رتینوتیک اسید بر روی سلول‌های $CD44^+$ در این مطالعه اثر ترکیبی آن با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورواوراسیل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی: مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی از نوع طرح کاربردی بنیادی می‌باشد که طی مدت زمان ۶ ماه در آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گرفت. رده‌ی سلولی KYSE-30 (سرطان سلول سنگفرشی انسان) از مؤسسه انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ محلول آنتی بیوتیک پنی سیلین / استرپتومایسین (شرکت Biovist) کشت داده شدند و در انکوباتور تحت دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 نگهداری شد (۱۰).

جداسازی سلولی با روش MACS: لایه سلولی کشت داده شده در کف پلیت با روش آنژیمی (تریپسین - EDTA) جدا شده و به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند. محلول آنتی بادی اولیه $CD44$ (شامل: ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی $CD44$ + ۸۰ میکرولیتر محلول جدا کننده + ۲۰ میکرولیتر عامل مسدود کننده) به رسوب سلولی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال تاریک ۸-۲۰ درجه سلسیوس انکوبه و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس محلول آنتی بادی ثانویه (شامل: ۸۰ میکرولیتر محلول جدا کننده + ۲۰ میکرولیتر آنتی PE میکروبیده) به رسوب سلولی اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال انکوبه شد. مرحله سانتریفوژ تکرار و رسوب سلولی حاصل جهت جداسازی سلولی در ستون مغناطیس (MACS = Magnetic Activated Cell Sorting) قرار داده شد و در پایان سلول‌های جدا شده با تکنیک MACS کشت داده شدند.

مکانیسم مرگ سلولی: در مطالعه حاضر، یافته های حاصل از فرایند مرگ سلولی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید بررسی شد (شکل ۲) و نتایج نشان داد که تیمار ترکیب ریتونیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش مرگ سلولی اولیه در سلولهای $CD44^+$ و $CD44^-$ شد ($p < 0.05$) اما بر روی مرگ ثانویه اثری نداشت. از سوی دیگر ترکیب ریتونیک اسید با ۵-فلورووراسیل در سلولهای $CD44^+$ باعث افزایش مرگ سلولی اولیه و ثانویه گردید ($p < 0.05$) اما در سلولهای $CD44^-$ چنین اثری را نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۱. IC_{50} سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل قبل و بعد از ترکیب آنها با ریتونیک اسید در سلولهای $CD44^+$ و $CD44^-$ KYSE-30

گروه	رده سلولی KYSE-30	$CD44$ مثبت Mean±SD	$CD44$ منفی Mean±SD
ریتونیک اسید (μM)		۱۴±۲/۶	۶/۴۸±۰/۹
سیس پلاتین (μg)		۳/۶۵±۰/۷	۱/۸±۰/۲
۵-فلورووراسیل (μg)		۱/۱۹±۰/۲	۰/۵۳±۰/۱۹
تیمار ترکیبی ریتونیک اسید+سیس پلاتین (μg)		۰/۵۷±۰/۱۵ ^a	۰/۷۲±۰/۲۲ ^a
تیمار ترکیبی ریتونیک اسید+۵-فلورووراسیل (μg)		۰/۵±۰/۱۷ ^b	۰/۴۴±۰/۲

a: اختلاف معنی دار نسبت به سیس پلاتین ($p < 0.05$); b: اختلاف معنی دار نسبت به ۵-فلورووراسیل ($p < 0.05$)

جدول ۲. درصد مرگ و میر اولیه-ثانویه سلولی، قبل و بعد از ترکیب ریتونیک اسید با سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل

گروه ها	آپتوز اولیه Mean±SD	آپتوز ثانویه Mean±SD
کنترل (درصد)	۱/۶±۰/۸۸	۰
ریتونیک اسید (درصد)	۲/۳±۰/۶۶	۱/۳±۰/۳۳
سیس پلاتین (درصد)	۸/۶±۰/۹	۳/۳±۰/۸۸
۵-فلورووراسیل (درصد)	۱۲±۱/۱	۵/۶±۱/۳
CD44 مثبت		
تیمار ترکیبی ریتونیک اسید+سیس پلاتین (درصد)	۱۳/۳±۰/۶ ^a	۵/۳±۰/۹
تیمار ترکیبی ریتونیک اسید+۵-فلورووراسیل (درصد)	۱۷±۱/۱۵ ^b	۱۱±۱/۱ ^b
CD44 منفی		
کنترل (درصد)	۲±۰/۵۷	۰/۶±۰/۳۳
ریتونیک اسید (درصد)	۸/۳±۰/۶۶	۲/۶±۰/۸۸
سیس پلاتین (درصد)	۱۵/۶۷±۱/۲	۶±۱
۵-فلورووراسیل (درصد)	۲۱±۲/۳	۹/۶±۰/۸۳
تیمار ترکیبی ریتونیک اسید+سیس پلاتین (درصد)	۲۰/۳±۲/۷ ^a	۷/۳±۱/۲
تیمار ترکیبی ریتونیک اسید+۵-فلورووراسیل (درصد)	۲۲/۶±۱/۹	۱۰/۶±۰/۹

a: اختلاف معنی دار نسبت به سیس پلاتین ($p < 0.05$); b: اختلاف معنی دار نسبت به ۵-فلورووراسیل ($p < 0.05$)

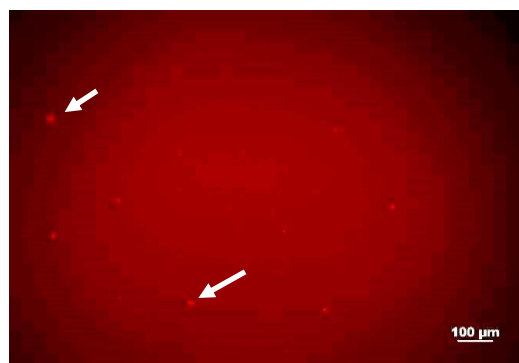
تشخیص می باشند. در نهایت تعداد سلولهای آپتوز اولیه و آپتوز ثانویه و نکروتیک شمارش گردید.

فلوسایتومتری (Flow Cytometry): برای رنگ آمیزی سلولها جهت فلوسایتومتری محلول یک میلی گرم رنگ DAPI در ۵۰ سی سی PBS تهیه شد. سلولهای $CD44^+$ و $CD44^-$ به مدت ۶ روز با ریتونیک اسید و سیس به مدت ۷۲ با سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل ساعت تیمار گردید پس از شستشو با PBS توسط ۳ سی سی الکل ۷۰٪ تثبیت شد و به مدت یک ساعت در یخچال چهار درجه سلسیوس انکوبه گردید. سپس ۷ سی سی PBS به سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۷۰۰ rpm سانتریفوژ و یک سی سی محلول دپی به رسوب سلولی اضافه گردید و هم زده شد. پنج دقیقه بعد مراحل مختلف چرخه سلولی با دستگاه فلوسایتومتری بررسی شد.

تجزیه تحلیل داده ها: جهت آنالیز آماری داده ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. در تمامی مراحل داده ها به صورت $mean \pm SD$ گزارش گردید. اختلاف آماری میان گروه های مختلف توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه بین آزمودنی (ANOVA) و پس آزمون توکی (Tukey) بررسی شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

جداسازی سلولها با MACS: جداسازی سلولهای $CD44^+$ از رده سلولی KYSE-30 با موفقیت انجام شد. سلولهای $CD44^+$ به دلیل رنگ آمیزی با آنتی بادی نشاندار با فیکواریترین در زیر میکروسکوپ فلورسانس به رنگ قرمز مشاهده می شوند (شکل ۱). سلولهای $CD44^+$ ۶/۲۵ درصد از کل جمعیت سلولی را شامل می شد.

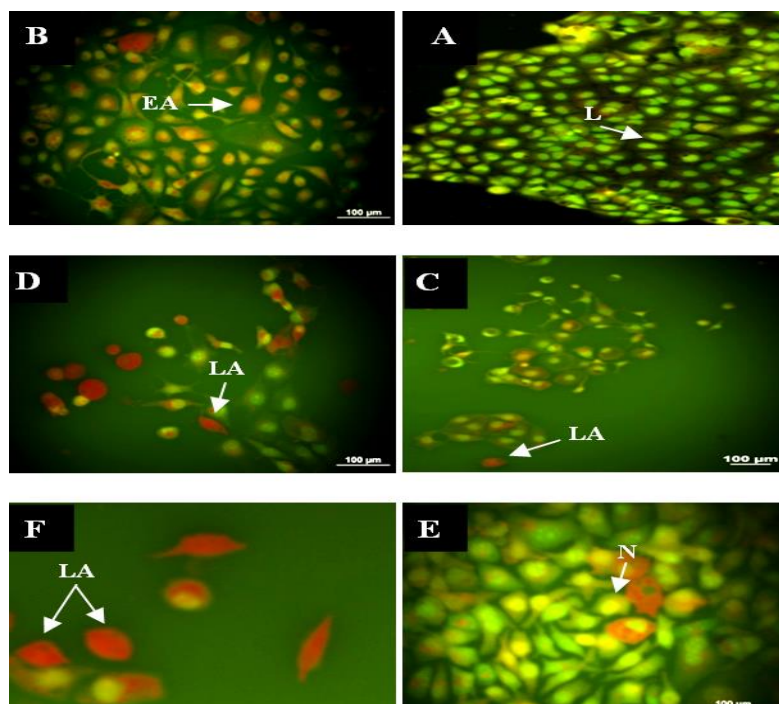


شکل ۱. سلولهای $CD44^+$ جدا شده از رده سلولی KYSE-30

تعیین فعالیت متابولیکی: ارزیابی IC_{50} با استفاده از روش فعالیت متابولیکی نشان داد که تیمار ترکیبی ریتونیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش معنی دار اثرات سمیت سیس پلاتین بر روی سلولهای $CD44^+$ و $CD44^-$ می گردد ($p < 0.05$) که با کاهش IC_{50} و افزایش مرگ میر سلولی همراه بود. بر خلاف سیس پلاتین، تیمار ترکیبی ریتونیک اسید با ۵-فلورووراسیل تنها بر روی سلولهای $CD44^+$ افزایش اثرات سمیتی ($p < 0.05$) را نشان داد (جدول ۱).

۵-فلوروآوراسیل باعث توقف در مرحله G_1/S شد. تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و ۵-فلوروآوراسیل فقط باعث افزایش توقف سلول‌های $CD44^+$ بدون تغییر فاز توقفی گردید (هر کدام $p < 0.05$) ولی بر روی سلول‌های $CD44^-$ اثری نداشت (جدول ۳).

بررسی چرخه سلولی به وسیله فلوسایتومتری: در این مطالعه آنالیز چرخه سلولی توسط فلوسایتومتری انجام و درصد سلول‌ها در مراحل G_1 ، S و G_2 چرخه سلولی با استفاده از Partec Flow Max محاسبه گردید (نمودارهای ۱ و ۲). نتایج حاصل نشان داد که سیس پلاتین باعث توقف در مرحله G_2/M و



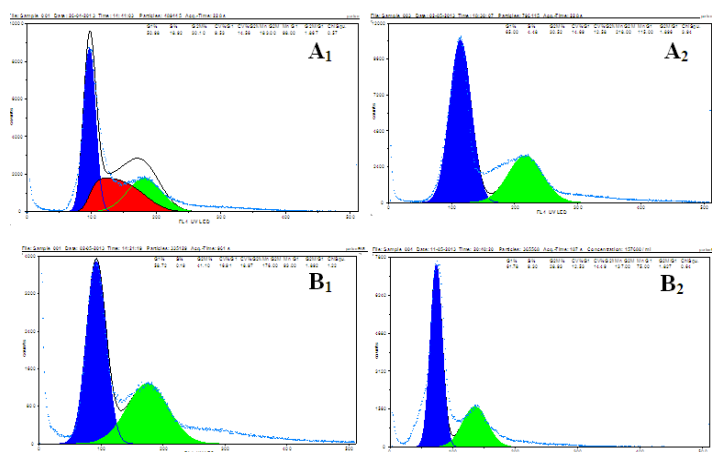
شکل ۲. تاثیر رتینوئیک اسید بر روی افزایش مرگ و میر سولی سیس پلاتین و ۵-فلوروآوراسیل با رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتدیوم بروماید در سلول‌های $CD44$ جدا شده از رده سلولی KYSE-30 ($\times 200$)

A: کنترل B: رتینوئیک اسید تمام ترانس C: سیس پلاتین D: رتینوئیک اسید تمام ترانس + سیس پلاتین E: ۵-فلوروآوراسیل F: رتینوئیک اسید تمام ترانس + ۵-فلوروآوراسیل
L: Live, N: Necrosis, EA: Early Apoptosis, LA: Late Apoptosis

جدول ۳. درصد توقف سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه سلولی قبل و بعد از ترکیب رتینوئیک اسید با سیس پلاتین، ۵-فلوروآوراسیل

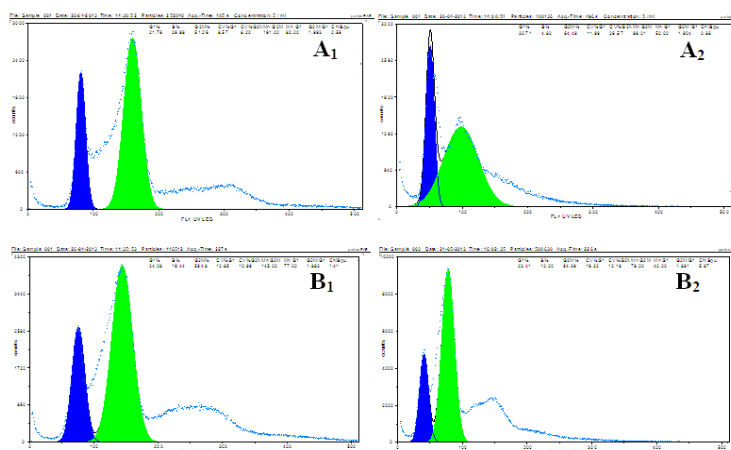
گروه‌ها	G_0/G_1 Mean $\pm$ SD	S Mean $\pm$ SD	G_2/M Mean $\pm$ SD
کنترل (درصد)	۴۹/۳ $\pm$ ۲/۹	۱۷/۸ $\pm$ ۱	۳۲/۹ $\pm$ ۱/۳
رتینوئیک اسید تمام ترانس (درصد)	۵۴/۴ $\pm$ ۱/۱۴	۲۴/۴ $\pm$ ۰/۸	۲۱/۰۹ $\pm$ ۱/۱۹
سیس پلاتین (درصد)	۲۲/۴ $\pm$ ۰/۷	۲۶ $\pm$ ۱/۹	۵۱/۴ $\pm$ ۲/۱
۵-فلوروآوراسیل (درصد)	۵۱/۳ $\pm$ ۲/۸	۱۸/۵۴ $\pm$ ۴/۵	۳۰/۱ $\pm$ ۱/۷
رتینوئیک اسید تمام ترانس + سیس پلاتین (درصد)	۲۹/۹ $\pm$ ۳/۱	۵/۸ $\pm$ ۱/۲	۶۴ $\pm$ ۲/۲ ^a
رتینوئیک اسید تمام ترانس + ۵-فلوروآوراسیل (درصد)	۶۵ $\pm$ ۴ ^b	۳/۶ $\pm$ ۱/۴	۳۰/۸ $\pm$ ۳/۹
کنترل (درصد)	۵۱/۳ $\pm$ ۳/۱	۲۱/۹ $\pm$ ۰/۹	۲۶/۸ $\pm$ ۱/۱
رتینوئیک اسید تمام ترانس (درصد)	۶۳/۱ $\pm$ ۱/۴	۲۶/۸۹ $\pm$ ۵/۳	۱۰ $\pm$ ۴
سیس پلاتین (درصد)	۲۴/۳ $\pm$ ۲/۸	۱۶/۲ $\pm$ ۲/۲	۵۹/۴ $\pm$ ۵
۵-فلوروآوراسیل (درصد)	۵۹/۷ $\pm$ ۲/۶	۱/۸۳ $\pm$ ۰/۲	۳۴/۴ $\pm$ ۲/۸۹
رتینوئیک اسید تمام ترانس + سیس پلاتین (درصد)	۲۳/۷ $\pm$ ۱/۹	۳/۱۰ $\pm$ ۱/۹	۶۵/۸ $\pm$ ۳/۳
رتینوئیک اسید تمام ترانس + ۵-فلوروآوراسیل (درصد)	۶۲/۵ $\pm$ ۲/۱	۷ $\pm$ ۲/۱	۳۳/۶ $\pm$ ۵

a: اختلاف معنی دار نسبت به سیس پلاتین ($p < 0.05$); b: اختلاف معنی دار نسبت به ۵-فلوروآوراسیل ($p < 0.05$)



نمودار ۱. اثرات تیمار ترکیبی ریتینوئیک اسید با ۵-فلوروآوراسیل بر توزیع چرخه سلولی در مقایسه با استفاده تنها از داروی ۵-فلوروآوراسیل

(آبی: مرحله G1، قرمز: مرحله S و سبز: مرحله G2 چرخه سلولی را نشان می دهد)، A₁: سلول های CD44⁺ تیمار شده با ۵-فلوروآوراسیل. A₂: سلول های CD44⁺ تیمار شده با ترکیب ریتینوئیک اسید و ۵-فلوروآوراسیل. B₁: سلولهای CD44⁻ تیمار شده با ۵-فلوروآوراسیل. B₂: سلولهای CD44⁻ تیمار شده با ترکیب ریتینوئیک اسید و ۵-فلوروآوراسیل



نمودار ۲. اثرات تیمار ترکیبی ریتینوئیک اسید با سیس پلاتین بر توزیع چرخه سلولی در مقایسه با استفاده تنها از داروی سیس پلاتین

(آبی: مرحله G1 و سبز: مرحله G2 چرخه سلولی را نشان می دهد)، A₁: سلول های CD44⁺ تیمار شده با سیس پلاتین. A₂: سلول های CD44⁺ تیمار شده با ترکیب ریتینوئیک اسید و سیس پلاتین. B₁: سلول های CD44⁻ تیمار شده با سیس پلاتین. B₂: سلول های CD44⁻ تیمار شده با ترکیب ریتینوئیک اسید و سیس پلاتین

بحث و نتیجه گیری

یافته های حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از تیمار ترکیبی ریتینوئیک اسید با داروی سیس پلاتین سبب افزایش معنی دار سمیت دارو، درصد سلول های آپوپتوز اولیه در سلولهای CD44⁺ و CD44⁻ و افزایش توقف چرخه سلولی در سلول های CD44⁺ می گردد. همچنین تیمار ترکیبی ریتینوئیک اسید با داروی ۵-فلوروآوراسیل به طور معنی داری سبب افزایش اثرات سمیتی دارو، درصد سلول های آپوپتوز اولیه و ثانویه و توقف چرخه سلولی در سلول های CD44⁺ شد. شناساگر CD44 جهت جداسازی سلول های بنیادی سرطان (رده KYSE-30) با روش MACS مورد استفاده قرار گرفت. ما در این مطالعه برای اولین بار درصد کمی از سلول های بنیادی سرطانی موجود در رده سلولی سرطان مری نشان داده شد، بدین صورت که نتایج بدست آمده نشان داد که از بین جمعیت های سلولی مورد مطالعه ۶/۲۵ درصد سلول ها CD44⁺ بود. Zhao و همکارانش با بررسی شناساگرهای رایج سلول های بنیادی سرطان از قبیل CD₃₂، CD₂₇₁، CD₁₃₃ و CD₉₀ و CD₄₄ بر روی رده سلولی سرطان سنگفرشی مری مشخص

نمودند که تنها بیان شناساگر CD44 همراه با تومورزایی بوده و سایر شناساگرها یا بیان نشده و یا بیان آنها رابطه عکس با قدرت تومورزایی داشت (۵). تیمار ۲۴ ساعته ریتینوئیک اسید بر روی سلول های CD44⁺ و CD44⁻ نشان داد ریتینوئیک اسید اثرات ضد تکثیری قابل ملاحظه ای بر روی سلول های جدا شده داشت که این اثر بر روی CD44⁺ بیشتر بود که احتمالاً به علت القاء تمایز آنها می باشد. مطالعات قبلی بر روی سرطان مری نشان داد که از بین گیرنده های مختلف ریتینوئیک اسید (RAR α و RAR β)، افزایش سطح بیان گیرنده RAR β به وسیله ریتینوئیک اسید باعث اثرات مهارتی بر روی رشد سلول های سرطان سنگفرشی شده است (۱۱). تیمار ترکیبی داروها با غلظت های زیر سمیت ریتینوئیک اسید باعث کاهش قابل ملاحظه مقاومت سلول های بنیادی سرطانی به خصوص سلول های بنیادی سرطانی CD44⁺ نسبت به استفاده به تنهایی از داروهای سیس پلاتین و ۵-فلوروآوراسیل شد که با کاهش IC₅₀ همراه بود. در مقایسه با ۵-فلوروآوراسیل، ترکیب ریتینوئیک اسید با سیس پلاتین اثرات

سمی بیشتری را روی $CD44^+$ و $CD44^-$ نشان داد. Hung و همکارانش با مطالعه بر روی رده‌های سلولی سرطان حلق و بینی گزارش کردند که تنها رقت-های پایین رتینوئیک اسید (یک میکرو مولار) باعث اثرات هم افزایی در ترکیب با سیس پلاتین می شود (۸) ولی مطالعه ما نشان داد که استفاده از غلظت‌های بالای رتینوئیک اسید می‌تواند باعث افزایش اثرات سمیتی داروها شود که ممکن است به دلیل مقاومت سلول‌های بنیادی سرطانی باشد. مطالعه تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها توسط رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید نشان داد که تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل سبب افزایش سلول‌های آپوپتوز اولیه در مقایسه با استفاده تنها از این داروها می گردد در صورتی که ترکیب رتینوئیک اسید با ۵-فلورووراسیل تنها باعث افزایش مرگ سلولی ثانویه در سلول‌های $CD44^+$ گردید. زهره Dalirsani و همکارانش با بررسی اثرات ۵-فلورووراسیل در ترکیب با ۱۳-سیس رتینوئیک اسید و ویتامین D₃ بر روی رده سلولی سرطان سنگفرشی دهان با استفاده از روش تعیین فعالیت متابولیکی و *end labeling* (TUNEL) نشان دادند که ترکیب ۵-فلورووراسیل و ۱۳-سیس رتینوئیک اسید اثرات مهاری بیشتری را بر روی تکثیر سلول‌های سرطان سنگفرشی دهان دارد و همچنین استفاده از ترکیب رتینوئیک اسید و ۵-فلورووراسیل اثرات آپوپتوز قابل ملاحظه‌ای را نسبت به استفاده تنها از آنها نشان می دهد که ممکن است ناشی از اثرات افزایشی رتینوئیک اسید بر روی ۵-

فلورووراسیل در سرطان سلول سنگفرشی دهان باشد (۱۲). مطالعه قبلی بیانگر این است سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل می‌توانند با اختلال در چرخه سلولی، آن را در مراحل G_1/G_1 , G_2/M و G_1/S متوقف نمایند. (۱۵-۱۳) مطالعه حاضر مؤید این مطلب است که تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین یا ۵-فلورووراسیل سبب افزایش توقف سلولی به ترتیب در فازهای G_1/S , G_2/M در سلول‌های $CD44^+$ شد ولی بر روی سلول‌های $CD44^-$ چنین اثری مشاهده نشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تیمار ترکیبی درصد سلول‌های متوقف شده را افزایش می‌دهد بدون آنکه باعث تغییر فاز توقفی سلول گردد. این مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیب رتینوئیک اسید همراه با داروهای سیس پلاتین و ۵-فلورووراسیل می‌تواند باعث افزایش اثرات ضد سرطانی داروها در غلظت‌های پایین تر از حد معمول بر روی سلول‌های مقاوم به درمان شود. در نتیجه استفاده از این روش می‌تواند بعنوان یک ترکیب درمانی جدید برای سرطان‌های دستگاه گوارش مطرح و از عوارض جانبی داروها نیز بکاهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر بهلولی رئیس دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و دکتر پیری مدیر پژوهشی دانشگاه به دلیل حمایت از این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

Increased Toxicity of Chemotherapeutic Drugs by All-Trans Retinoic Acid in Cd44 Cells

A. Abbasi (MSc)¹, M. Mazani (PhD)*¹, N. Najafzadeh (PhD)², M. Amani (PhD)³, H. Sheykhkanlooy Milan (PhD)⁴

1. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R. Iran

2. Department of Anatomy & Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R. Iran

3. Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, I.R. Iran

4. Department of Physiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch of Azad Islamic University, Hamedan, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(3); Mar 2016; PP: 25-32

Received: Feb 4th 2015, Revised: Dec 6th 2015, Accepted: Feb 4th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In recent studies, undifferentiated CD₄₄ cells have been introduced as the major cause of chemotherapeutic drug resistance in esophageal cancer. In this study, we aimed to evaluate the effects of all-trans retinoic acid on reducing chemotherapeutic drug resistance and improving the associated toxic effects.

METHODS: In this clinical study, CD₄₄⁺ and CD₄₄⁻ cells were separated from KYSE-30 cell line, using magnetic-activated cell sorting (MACS) method. The cytotoxic effects of retinoic acid treatment, combined with cisplatin and 5-fluorouracil, were separately evaluated in two cell groups, i.e., CD₄₄⁺ and CD₄₄⁻. Cytotoxicity was determined by identifying cellular metabolic activity, acridine orange/ethidium bromide staining, and flow cytometry.

FINDINGS: In this study, CD₄₄ marker was expressed in 6.25% of the cell population in KYSE-30 cell line. The results of flow cytometry revealed that treatment with a combination of retinoic acid and chemotherapeutic drugs could improve cell cycle arrest in CD₄₄⁺ cells ($p < 0.05$), unlike CD₄₄⁻ cells. Determination of cellular metabolic activity, increased cell apoptosis along with decreased half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), and acridine orange/ethidium bromide staining were indicative of the increased percentage of primary and secondary apoptotic CD₄₄⁺ cells. However, in CD₄₄⁻ cells, these effects were only observed by using a combination of retinoic acid and cisplatin ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The present results showed that all-trans retinoic acid could increase the toxicity of cisplatin and 5-fluorouracil in CD₄₄⁺ cells.

KEY WORDS: KYSE-30 cell line, Retinoic acid, Cisplatin, 5-fluorouracil, CD₄₄, Chemotherapy.

Please cite this article as follows:

Abbasi A, Mazani M, Najafzadeh N, Amani M, Sheykhkanlooy Milan H. Increased Toxicity of Chemotherapeutic Drugs by All-Trans Retinoic Acid in Cd44 Cells. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(4):25-32.

*Corresponding Author: M. Mazani (PhD)

Address: Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Daneshgah St. Ardabil, I.R. Iran

Tel: +98 45 33510052

E-mail: m.mazani@arums.ac.ir

References

1. Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2876-82.
2. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(23):2241-52.
3. 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(1):1232-52.
4. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006; 355(12):1253-61.
5. Zhao JS, Li WJ, Ge D, Zhang PJ, Li JJ, Lu CL, et al. Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One*. 2011;6(6): 21419.
6. Zhang C, Li C, He F, Cai Y, Yang H. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(11):1679-86.
7. 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(1):167-74.
8. 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*. 2013;270(2):695-704.
9. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41.
10. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(2):185-7.
11. Xu XC, Liu X, Tahara E, Lippman SM, Lotan R. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor-beta is associated with retinol sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res*. 1999; 59(10):2477-83.
12. 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 Den Prac*. 2012;13(3):345-50.
13. 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(9):749-55.
14. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. *Mol Pharmacol*. 2001; 59(4):657-63.
15. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, 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(3):1029-37.