مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۳، اسفند ۱۳۹۴، صفحه ۳۲-۲۵

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

اسدالله عباسی (MSc)[۱]، محمد مأذنی (PhD)*[۱]، نوروز نجف زاده (PhD)[۲]، مجتبی امانی (PhD)[۳]، حمید شیخ کانلوی 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 $CD_{44}$ 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 سمیّتی آنها می باشد.

**مواد و روشها:** دراین مطالعه تجربی سلول‌های $CD_{44}^{+}$ و $CD_{44}^{-}$ با روش MACS از رده سلولی KYSE-30 جدا گردید. اثرات سمیتی تیمار رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و رتینوئیک اسید با ۵-فلوراوراسیل به طور مجزا بر روی دو گروه سلولی $CD_{44}^{+}$ و$CD_{44}^{-}$ 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. یافته های حاصل از روش فلوسایتومتری نشان داد که تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با داروها باعث افزایش توقف سیکل سلولی در سلول‌های $CD_{44}^{+}$ شد ($p<۰/۰۵$) اما در سلول‌های $CD_{44}^{-}$ چنین اثری را نشان نداد . روش تعین فعالیت متابولیکی افزایش مرگ میر سلولی به همراه کاهش $IC_{50}$ و رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید افزایش درصد سلول های آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول های $CD_{44}^{+}$ نشان داد اما در سلولهای $CD_{44}^{-}$ این اثرات فقط در ترکیب رتینوئیک اسید با سیس پلاتین مشاهده شد. ($p<۰/۰۵$)

**نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که رتینوئیک اسید تمام ترانس، باعث افزایش سمیت داروهای سیس پلاتین و ۵- فلوراوراسیل بر روی سلول‌های $CD_{44}^{+}$ گردید.

**واژه‌های کلیدی: رده سلولی KYSE-30، رتینوئیک اسید، سیس پلاتین، ۵- فلوراوراسیل، $CD_{44}$، شیمی درمانی.**

## مقدمه

سرطان مری هشتمین سرطان شایع در دنیا و ششمین علت منجر به مرگ ناشی از سرطان‌ها می‌باشد. از عوامل موثر در بروز این سرطان می‌توان به مصرف دخانیات، الکل و بیماری بارتز اشاره کرد.(۲و۱) اخیرا علت عود و رشد مجدد تومورهای سرطانی را وجود سلول‌های بنیادی سرطان در داخل تومورها مطرح کرده‌اند که نسبت به عوامل شیمی درمانی مقاومت قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند (۴و۳). 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 رتینوئیدهای مختلف در حضور داروهای سیس پلاتین و ۵- فلوراوراسیل در 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- فلوراوراسیل 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-

▣ 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 مأذنی
آدرس: اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی. تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۱۰۰۵۲
E-mail: m.mazani@arums.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]

TW04) بررسی کردند ارزیابی مورفولوژی بعد از تیمار با غلظت های پایین رتینوئیک اسید نشان دهنده افزایش تعداد سلول معلق و کاهش سلول‌های متصل در هر دو رده سلولی بود ( باعث مرگ سلول‌ها شده بود ) سلول ها حالت مسطح و پهن به خود گرفته بودند ( تمایز یافته بودند ) و تحت تاثیر غلظت‌های پایین رتینوئیک اسید رشد سلولی در هر دو رده سلولی به طور قابل ملاحظه ای مهار کاهش یافته بود. استفاده ترکیب تیمار رتینوئیک اسید با سیس پلاتین حاکی از اثرات هم افزایی ترکیب تیمار بود استفاده تنها از رقت‌های پایین رتینوئیک اسید باعث اثرات هم افزایی در ترکیب با سیس پلاتین شده بود (۸). مهمترین شناساگری که در سطح سلول‌های بنیادی مری بیان می‌شود شناساگر $CD_{44}$ است (۹).

نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی نشان داده است که رتینوئیک اسید تمام ترانس می‌تواند باعث القای تمایز در سلول‌های بنیادی سرطانی $CD_{44}^{+}$ به سلول‌های $CD_{44}^{-}$ شده و به‌طور قابل توجهی بیان mRNA شناساگر $CD_{44}^{+}$ را کاهش و تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی را مهار کند (۵). سلول‌های $CD_{44}^{+}$ نسبت به سلول‌های $CD_{44}^{-}$ مقاومت بیشتری نسبت به عوامل شیمی درمانی رایج از جمله سیس پلاتین و ۵- فلوراوراسیل دارند و سبب عود و رشد مجدد تومورها می‌گردند(۵). بنابراین انتخاب داروهایی که هدف آنها سلولهای سرطانی $CD_{44}^{+}$ باشد ممکن است باعث معالجه سرطان بدون نیاز به جراحی و برداشت بافت باشد. لذا با توجه به اثر تمایزگری رتینوئیک اسید بر روی سلول‌های $CD_{44}^{+}$ در این مطالعه اثر ترکیبی آن با داروهای سیس پلاتین و۵- فلوراوراسیل 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 و۱٪ محلول آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (شرکت Biovist) کشت داده شدند و در انکوباتور تحت دمای ۳۷°C و ۵ درصد $CO_2$ نگهداری شد (۱۰).

**جداسازی سلولی با روش MACS:** لایه سلولی کشت داده شده در کف پلیت با روش آنزیمی (تریپسین -EDTA) جدا شده و به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. محلول آنتی بادی اولیه $CD_{44}$ (شامل: ۱۰ میکرولیتر آنتی بادی $CD_{44}$ + ۸۰ میکرولیتر محلول جدا کننده + ۲۰ میکرولیتر عامل مسدود کننده) به رسوب سلولی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال تاریک ۸-۲ درجه سلسیوس انکوبه و مجددا به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس محلول آنتی بادی ثانویه (شامل: ۸۰ میکرولیتر محلول جدا کننده + ۲۰ میکرولیتر آنتی PE میکروبید) 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 سلول های جدا شده با تکنیک MACS کشت داده شدند.

**گروهای تیمار:** سلول های رده KYSE-30 با استفاده از روش MACS به دو گروه $CD_{44}^{+}$ و $CD_{44}^{-}$ تقسیم شد سپس هر گروه به طور جداگانه به چهار زیر گروه تقسیم و به ترتیب درمان های : ۱) تیمار با سیس پلاتین به مدت ۷۲ ساعت ۲) تیمار با ۵-فلوراوراسیل به مدت ۷۲ ساعت ۳) تیمار اولیه با رتینوئیک اسید به مدت شش روز سپس تیمار با سیس پلاتین به مدت ۷۲ ساعت و ۴) تیمار اولیه با رتینوئیک اسید به مدت شش روز سپس تیمار با ۵-فلوراوراسیل به مدت ۷۲ ساعت را دریافت نمودند.

**تعیین غلظت زیر سمیت رتینوئیک اسید:** برای تعیین غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک اسید، مطالعه تیمار با غلظت های مختلف رتینوئیک اسید(۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ )به مدت ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های $CD_{44}^{-}$ و $CD_{44}^{+}$ در پلیت های ۹۶ خانه انجام گرفت تا غلظتی که موجب مهار ۵۰ درصد فعالیت متابولیکی می شود، تعیین گردد. ۴ ساعت قبل از اتمام دوره تیمار محیط روئی سلول را خارج و ۱۸۰ لاندا محیط تازه عاری از سرم به همراه ۲۰ لاندا رنگ MTT ۲/۵ میلی‌گرم 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 $IC_{50}$ (غلظتی که موجب کاهش ۵۰ درصد فعالیت می‌شود) بدست آمد. در نهایت غلظت های زیر سمیت ۵/۴ و ۱۳ رتینوئیک اسید به ترتیب برای تیمار ترکیبی با داروها در سلول‌های $CD_{44}^{-}$ و $CD_{44}^{+}$ مورد استفاده قرار گرفت.

**ترکیب درمانی:** سلول‌های $CD_{44}^{-}$ و $CD_{44}^{+}$ به مدت شش روز در حضور و عدم حضور غلظت‌های زیر سمیت رتینوئیک 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 نئوبار سلول‌ها شمارش شد. تعداد ۱۰ هزار عدد سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ازپلیت 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-فلوراوراسیل (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۶) جایگزین شده و به مدت ۷۲ ساعت دیگر انکوباسیون ادامه یافت (۷). آزمایشات در پلیت های ۹۶ خانه ای سه بار تکرار گردید و در نهایت میانگین سه بار تکرار آزمایشات گزارش گردید.

**رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم 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 با رتینوئیک اسید و ۷۲ ساعت با سیس پلاتین و ۵-فلوراوراسیل) تیمار گردیدند. پس از اتمام دوره تیمار نیم میلی لیتر محلول ۱۰۰ میکروگرم آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید به هر چاهک اضافه شد. پنج دقیقه بعد با میکروسکوپ فلوروسنت مدل المپیوس تصاویری تهیه شد. در تصاویر ۳ نوع تغییر مورفولوژیکی را می توان 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

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]

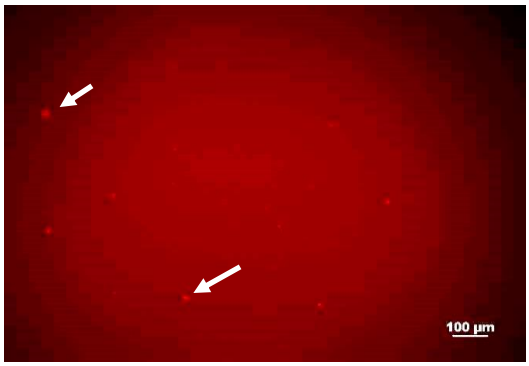
تشخیص می باشند. در نهایت تعداد سلول‌های آپوپتوز اولیه و آپوپتوز ثانویه و نکروتیک شمارش گردید.

**فلوسایتومتری (Flow Cytometry):** برای رنگ آمیزی سلولها جهت فلوسایتومتری محلول یک میلی‌گرم رنگ DAPI در ۵۰ سی‌سی PBS تهیه شد. سلولهای $CD_{44}^+$ و $CD_{44}^-$ به مدت ۶ روز با رتینوئیک اسید و سپس به مدت ۷۲ با سیس پلاتین و ۵-فلوروواراسیل 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 سی‌سی PBS به سوسپانسیون سلولی اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۷۰۰ rpm سانتریفوژ و یک سی‌سی 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 داده‌ها:** جهت آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. در تمامی مراحل داده ها به صورت mean±SD گزارش گردید. اختلاف آماری میان گروه‌های مختلف توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه بین آزمودنی (ANOVA) و پس آزمون توکی (Tuky) بررسی شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

جداسازی سلول‌ها با MACS: جداسازی سلول‌های $CD_{44}^+$ از رده سلولی KYSE-30 با موفقیت انجام شد. سلول‌های $CD_{44}^+$ به دلیل رنگ آمیزی با آنتی بادی نشاندار با فیکواریترین در زیر میکروسکوپ فلورسانس به رنگ قرمز مشاهده می شوند (شکل ۱). سلول‌های $CD_{44}^+$ ۶/۲۵ درصد از کل جمعیت سلولی را شامل می شد.




**شکل ۱. سلول‌های $CD_{44}^+$ جدا شده از رده سلولی KYSE-30**

**تعیین فعالیت متابولیکی:** ارزیابی $IC_{50}$ با استفاده از روش فعالیت متابولیکی نشان داد که تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش معنی‌دار اثرات سمیت سیس پلاتین بر روی سلول‌های $CD_{44}^+$ و $CD_{44}^-$ می‌گردد ($p<۰/۰۵$) که با کاهش $IC_{50}$ و افزایش مرگ میر سلولی همراه بود. بر خلاف سیس پلاتین، تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با ۵-فلوروواراسیل تنها بر روی سلولهای $CD_{44}^+$ افزایش اثرات سمیتی ($p<۰/۰۵$) را نشان داد (جدول ۱).

**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 رتینوئیک اسید با سیس پلاتین باعث افزایش مرگ سلولی اولیه در سلولهای $CD_{44}^+$ و $CD_{44}^-$ شد ($p<۰/۰۵$) اما بر روی مرگ ثانویه اثری نداشت. از سوی دیگر ترکیب رتینوئیک اسید با ۵-فلوروواراسیل در سلول های $CD_{44}^+$ باعث افزایش مرگ سلولی اولیه و ثانویه گردید ($p<۰/۰۵$) اما در سلول های $CD_{44}^-$ چنین اثری را نشان نداد (جدول ۲).

**جدول ۱. $IC_{50}$ سیس پلاتین و ۵-فلوروواراسیل قبل و بعد از ترکیب آنها با رتینوئیک اسید در سلول‌های $CD_{44}^+$ و $CD_{44}^-$ جدا شده از رده سلولی KYSE-30**

| رده سلولی KYSE-30 | $CD_{44}$ مثبت | $CD_{44}$ منفی |
|---|---|---|
| گروه | Mean±SD | Mean±SD |
| رتینوئیک اسید (µM) | ۱۴±۲/۶ | ۶/۴۸±۰/۹ |
| سیس پلاتین (µg) | ۳/۶۵±۰/۷ | ۱/۸±۰/۲ |
| ۵-فلوروواراسیل (µg) | ۱/۱۹±۰/۲ | ۰/۵۳±۰/۱۹ |
| تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید+سیس پلاتین (µg) | ۰/۵۷±۰/۱۵ [a] | ۰/۷۲±۰/۲۲ [a] |
| تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید+۵-فلوروواراسیل (µg) | ۰/۵±۰/۱۷ [b] | ۰/۴۴±۰/۲ |

a: اختلاف معنی دار نسبت به سیس پلاتین ($p<۰/۰۵$)، b: اختلاف معنی دار نسبت به ۵-فلوروواراسیل ($p<۰/۰۵$)

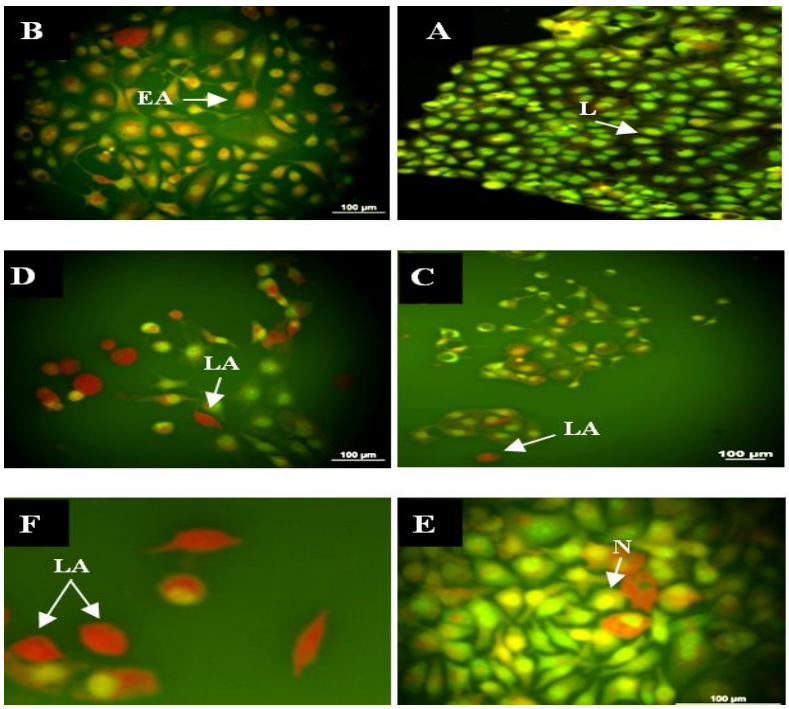
**جدول۲. درصد مرگ و میر اولیه-ثانویه سلولی، قبل و بعد از ترکیب رتینوئیک اسید با سیس‌پلاتین و ۵-فلوروواراسیل**

| گروه ها | | آپوپتوز اولیه | آپوپتوز ثانویه |
|---|---|---|---|
| | | Mean±SD | Mean±SD |
| $CD_{44}$ مثبت | کنترل(درصد) | ۱/۶±۰/۸۸ | ۰ |
| | رتینوئیک اسید(درصد) | ۲/۳±۰/۶۶ | ۱/۳±۰/۳۳ |
| | سیس پلاتین(درصد) | ۸/۶±۰/۹ | ۳/۳±۰/۸۸ |
| | ۵-فلوروواراسیل(درصد) | ۱۲±۱/۱ | ۵/۶±۱/۳ |
| | تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید+سیس پلاتین(درصد) | ۱۳/۳±۰/۶[a] | ۵/۳±۰/۹ |
| | تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید+۵-فلوروواراسیل(درصد) | ۱۷±۱/۱۵ [b] | ۱۱±۱/۱ [b] |
| $CD_{44}$ منفی | کنترل(درصد) | ۲±۰/۵۷ | ۰/۶±۰/۳۳ |
| | رتینوئیک اسید(درصد) | ۸/۳±۰/۶۶ | ۲/۶±۰/۸۸ |
| | سیس پلاتین(درصد) | ۱۵/۶۷±۱/۲ | ۶±۱ |
| | ۵-فلوروواراسیل(درصد) | ۲۱±۲/۳ | ۹/۶±۰/۸۳ |
| | تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید+سیس پلاتین(درصد) | ۲۰/۳±۲/۷[a] | ۷/۳±۱/۲ |
| | تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید+۵-فلوروواراسیل(درصد) | ۲۲/۶±۱/۹ | ۱۰/۶±۰/۹ |

a: اختلاف معنی دار نسبت به سیس پلاتین ($p<۰/۰۵$)، b: اختلاف معنی دار نسبت به ۵-فلوروواراسیل ($p<۰/۰۵$)

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]

**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 ۵-فلوروواوراسیل باعث توقف در مرحله $G_1/S$ شد. تیمار ترکیب رتینوئیک اسید با سیس پلاتین و ۵-فلوروواوراسیل فقط باعث افزایش توقف سلول های $CD_{44}^+$ بدون تغییر فاز توقفی گردید (هر کدام $p<۰/۰۵$) ولی بر روی سلول‌های $CD_{44}^-$ اثری نداشت (جدول ۳).




**شکل ۲. تاثیر رتینوئیک اسید بر روی افزایش مرگ و میر سولی سیس پلاتین و ۵-فلوروواوراسیل با رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتدیوم بروماید در سلول‌های $CD_{44}$ جدا شده از رده سلولی KYSE-30 (×۲۰۰)**

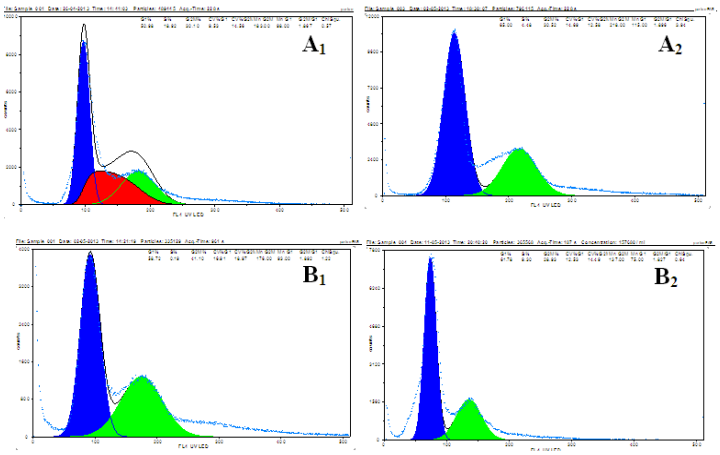
**A**: کنترل B: رتینوئیک اسید تمام ترانس C: سیس پلاتین D: رتینوئیک اسید تمام ترانس+ سیس پلاتین E: ۵- فلوروواوراسیل F: رتینوئیک اسید تمام ترانس+۵-فلوروواوراسیل L: Live, N: Necrosis, EA: Early Apoptosis, LA: Late Apoptosis

**جدول ۳. درصد توقف سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه سلولی قبل و بعد از ترکیب رتینوئیک اسید با سیس‌پلاتین، ۵-فلوروواوراسیل**

| گروه ها | | G0/$G_1$ Mean±SD | S Mean±SD | $G_2$/M Mean±SD |
|---|---|---|---|---|
| $CD_{44}$ مثبت | کنترل(درصد) | ۴۹/۳±۲/۹ | ۱۷/۸±۱ | ۳۲/۹±۱/۳ |
| | رتینوئیک اسید تمام ترانس(درصد) | ۵۴/۴±۱/۱۴ | ۲۴/۴±۰/۸ | ۲۱/۰۹±۱/۱۹ |
| | سیس پلاتین (درصد) | ۲۲/۴±۰/۷ | ۲۶±۱/۹ | ۵۱/۴±۲/۱ |
| | ۵-فلوروواوراسیل (درصد) | ۵۱/۳±۲/۸ | ۱۸/۵۴±۴/۵ | ۳۰/۱±۱/۷ |
| | رتینوئیک اسید تمام ترانس+سیس پلاتین (درصد) | ۲۹/۹±۳/۱ | ۵/۸±۱/۲ | ۶۴±۲/۲ [a] |
| | رتینوئیک اسید تمام ترانس+۵-فلوروواوراسیل (درصد) | ۶۵±۴ [b] | ۳/۶±۱/۴ | ۳۰/۸±۳/۹ |
| $CD_{44}$ منفی | کنترل (درصد) | ۵۱/۳±۳/۱ | ۲۱/۹±۰/۹ | ۲۶/۸±۱/۱ |
| | رتینوئیک اسید تمام ترانس (درصد) | ۶۳/۱±۱/۴ | ۲۶/۸۹±۵/۳ | ۱۰±۴ |
| | سیس پلاتین (درصد) | ۲۴/۳±۲/۸ | ۱۶/۲±۲/۲ | ۵۹/۴±۵ |
| | ۵-فلوروواوراسیل (درصد) | ۵۹/۷±۲/۶ | ۱/۸۳±۰/۲ | ۳۴/۴±۲/۸۹ |
| | رتینوئیک اسید تمام ترانس+ سیس پلاتین (درصد) | ۲۳/۷±۱/۹ | ۳/۱۰±۱/۹ | ۶۵/۸±۳/۲ |
| | رتینوئیک اسید تمام ترانس+۵-فلوروواوراسیل (درصد) | ۶۲/۵±۲/۱ | ۷±۲/۱ | ۳۳/۶±۵ |

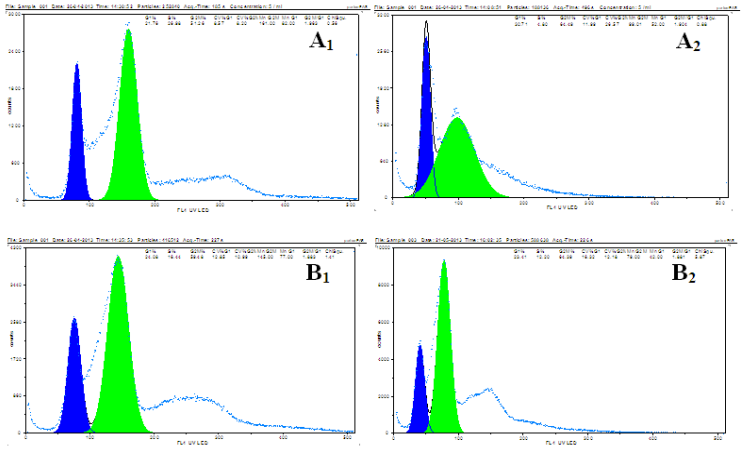
a: اختلاف معنی دار نسبت به سیس پلاتین ($p<۰/۰۵$)، b: اختلاف معنی دار نسبت به ۵-فلوروواوراسیل ($p<۰/۰۵$)

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]




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

(آبی: مرحله G1، قرمز: مرحله S و سبز: مرحله G2 چرخه سلولی را نشان می دهد)، $A_1$: سلول های $CD_{44}^+$ تیمار شده با ۵-فلوروواوراسیل. $A_2$: سلول های $CD_{44}^+$تیمار شده با ترکیب رتینوئیک اسید و ۵-فلوروواوراسیل. $B_1$: سلولهای $CD_{44}^-$ تیمار شده با ۵-فلوروواوراسیل. $B_2$: سلولهای $CD_{44}^-$ تیمار شده با ترکیب رتینوئیک اسید و ۵-فلوروواوراسیل




**نمودار ۲. اثرات تیمار ترکیبی رتینوئیک 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)، $A_1$: سلول های $CD_{44}^+$ تیمار شده با سیس پلاتین. $A_2$ : سلول های $CD_{44}^+$تیمار شده با ترکیب رتینوئیک اسید و سیس پلاتین.

$B_1$: سلول های $CD_{44}^-$ تیمار شده با سیس پلاتین. $B_2$: سلول های $CD_{44}^-$تیمار شده با ترکیب رتینوئیک اسید و سیس پلاتین

## بحث و نتیجه گیری

یافته های حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با داروی سیس پلاتین سبب افزایش معنی‌دار سمیت دارو، درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه در سلولهای $CD_{44}^+$ و $CD_{44}^-$ و افزایش توقف چرخه سلولی در سلول‌های $CD_{44}^+$ می‌گردد. همچنین تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با داروی ۵-فلوروواوراسیل به طور معنی‌داری سبب افزایش اثرات سمیتی دارو، درصد سلول‌های آپوپتوز اولیه و ثانویه و توقف چرخه سلولی در سلول‌های $CD_{44}^+$ شد. شناساگر $CD_{44}$ جهت جداسازی سلول‌های 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 جمعیت‌های سلولی مورد مطالعه ۶/۲۵ درصد سلول‌ها $CD_{44}^+$ بود. Zhao و همکارانش با بررسی شناساگرهای رایج سلول‌های بنیادی سرطان از قبیل $CD_{32}$، $CD_{271}$، $CD_{133}$، $CD_{90}$ و $CD_{44}$ بر روی رده سلولی سرطان سنگفرشی مری مشخص نمودند که تنها بیان شناساگر $CD_{44}$ همراه با تومورزایی بوده و سایر شناساگرها یا بیان نشده و یا بیان آنها رابطه عکس با قدرت تومورزایی داشت (۵).

تیمار ۲۴ ساعته رتینوئیک اسید بر روی سلول های $CD_{44}^+$ و $CD_{44}^-$ نشان داد رتینوئیک اسید اثرات ضد تکثیری قابل ملاحظه‌ای بر روی سلول‌های جدا شده داشت که این اثر بر روی $CD_{44}^+$ بیشتر بود که احتمالا به علت القاء تمایز آنها می باشد. مطالعات قبلی بر روی سرطان مری نشان داد که از بین گیرنده‌های مختلف رتینوئیک اسید ($RAR_\beta$ و $RAR_\alpha$)، افزایش سطح بیان گیرنده $RAR_\beta$ به وسیله رتینوئیک اسید باعث اثرات مهاری بر روی رشد سلول-های سرطان سنگفرشی شده است(۱۱). تیمار ترکیبی داروها با غلظت های زیر سمیت رتینوئیک اسید باعث کاهش قابل ملاحظه مقاومت سلول‌های بنیادی سرطانی به خصوص سلول‌های بنیادی سرطانی $CD_{44}^+$ نسبت به استفاده به تنهایی از داروهای سیس پلاتین و ۵-فلوروواوراسیل شد که با کاهش $IC_{50}$ همراه بود. در مقایسه با ۵-فلوروواوراسیل، ترکیب رتینوئیک با اسید سیس پلاتین اثرات

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]

سمی بیشتری را روی $CD_{44}^{+}$ و $CD_{44}^{-}$ 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-فلوراوراسیل سبب افزایش سلول‌های آپوپتوز اولیه در مقایسه با استفاده تنها از این داروها می گردد در صورتی که ترکیب رتینوئیک اسید با ۵-فلوراوراسیل تنها باعث افزایش مرگ سلولی ثانویه در سلول های $CD_{44}^{+}$ گردید. زهره Dalirsani و همکارانش با بررسی اثرات ۵-فلوراوراسیل در ترکیب با ۱۳- سیس رتینوئیک اسید و ویتامین $D_3$ بر روی رده سلولی سرطان سنگفرشی دهان با استفاده از روش تعیین فعالیت متابولیکی و transferase dUTP nick Terminal dexynucleptidyl end labeling(TUNEL) نشان دادند که ترکیب ۵-فلوراوراسیل 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-فلوراوراسیل 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-فلوراوراسیل در سرطان سلول سنگفرشی دهان باشد (۱۲). مطالعه قبلی بیانگر این است سیس پلاتین و ۵-فلوراوراسیل می‌توانند با اختلال در چرخه سلولی، آن را در مراحل $G_0/G_1$، $G_2/M$ و $G_1/S$ متوقف نماید.(۱۵-۱۳) مطالعه حاضر مؤید این مطلب است که تیمار ترکیبی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین یا ۵-فلوراوراسیل سبب افزایش توقف سلولی به ترتیب در فاز های $G_2/M$، $G_1/S$ در سلول های $CD_{44}^{+}$ شد ولی بر روی سلول های $CD_{44}^{-}$ 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-فلوراوراسیل می تواند باعث افزایش اثرات ضد سرطانی داروها در غلظت های پایین تر از حد معمول بر روی سلول های مقاوم به درمان شود. در نتیجه استفاده از این روش می تواند بعنوان یک ترکیب درمانی جدید برای سرطان های 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.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]

# 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 $CD_{44}$ 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, $CD_{44}^+$ and $CD_{44}^-$ 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., $CD_{44}^+$ and $CD_{44}^-$. Cytotoxicity was determined by identifying cellular metabolic activity, acridine orange/ethidium bromide staining, and flow cytometry.

**FINDINGS:** In this study, $CD_{44}$ 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 $CD_{44}^+$ cells ($p<0.05$), unlike $CD_{44}^-$ cells. Determination of cellular metabolic activity, increased cell apoptosis along with decreased half maximal inhibitory concentration ($IC_{50}$), and acridine orange/ethidium bromide staining were indicative of the increased percentage of primary and secondary apoptotic $CD_{44}^+$ cells. However, in $CD_{44}^-$ 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 $CD_{44}^+$ cells.

**KEY WORDS:** *KYSE-30 cell line, Retinoic acid, Cisplatin, 5-fluorouracil, $CD_{44}$, 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

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]

## 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.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.4.8 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.18.3.25 ]