مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
سال ۱۳۹۹، دوره ۲۲، صفحه ۳۹۵-۳۸۸

# اثر هایپرترمی بر بیان ژن‌های ایفلاکس دارویی MDR1 و MRP4 در سلول‌های سرطانی کولورکتال

زکیه قربانی (PhD)[۱]، منصور حیدری (PhD)[۲]، مجتبی جعفری‌نیا (PhD)[۱]، مهدی روحانی (PhD)[۳]، ابوالفضل اکبری (PhD)[۴*]

۱-گروه ژنتیک مولکولی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
۲-گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳-گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴-مرکز تحقیقات کولورکتال، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

**دریافت: ۹۹/۲/۳۱، اصلاح: ۹۹/۶/۴، پذیرش: ۹۹/۶/۱۵**

## خلاصه

**سابقه و هدف:** هایپرترمی به عنوان یکی از درمان‌های نوین و کمکی سرطان، در مهار ترمیم آسیب DNA، افزایش حساسیت پرتویی سلول‌های بنیادی سرطانی، افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو، مهار مسیرهای سیگنالینگ سرطان گزارش شده است که موجب آپوپتوز، سرکوب شدن تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی و اختلال در عملکرد سلولی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر هایپرترمی بر الگوی بیان ژن‌های مقاومت دارویی و بقاء سلولی است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، دو رده سلولی آدنوکارسینومای کولورکتال انسانی HT-29 و SW-48 کشت داده شد. سلول‌های گروه هایپرترمی و شاهد به مدت ۲ ساعت به ترتیب در دمای ۴۲ یا ۴۳ درجه سانتی گراد و ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس اثر هایپرترمی روی بقاء سلول با روش MTT بررسی گردید. همچنین الگوی بیان ژن‌های MDR1 و MRP4 با استفاده از روش qRT-PCR اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** هایپرترمی موجب کاهش بقاء سلول‌ها شد اما این کاهش معنی‌دار نبود. هایپرترمی بیان ژن MDR1 را در سلول‌های SW-48 کاهش داد (p=۰/۰۰۷). اگرچه بیان MDR1 در سلول‌های HT-29 به‌صورت قابل توجهی در ۴۲ درجه سانتیگراد کاهش داشت، اما بین گروه‌های هایپرترمی و گروه کنترل تفاوت معنی داری دیده نشد. همچنین هایپرترمی، هیچ تاثیر معنی‌داری روی بیان ژن MRP4 در رده‌های سلولی SW-48 و HT-29 نداشت.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که هایپرترمی بیان ژن‌های مربوط به مقاومت دارویی را کاهش می‌دهد، اما تأثیر معنی داری بر روی بقاء سلول‌ها ندارد.

**واژه‌های کلیدی: ژن‌های مقاومت دارویی، سرطان کولورکتال، بیان ژن، هایپرترمی، تومورزایی.**

## مقدمه

سرطان کولورکتال (Colorectal Cancer= CRC) یکی از دلایل قابل توجه مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان محسوب می‌شود. از این‌رو، مطالعه سرطان، درمان و پیشگیری آن بسیار حائز اهمیت است (۳-۱). بیماری حدود ۹۰٪ افراد مبتلا به CRC اگر در اوایل مورد آزمایش و غربالگری قرار بگیرند، قابل پیشگیری است. اما به دلیل پیچیدگی ناشی از تعداد زیادی تغییرات ژنتیکی و اختلال در مسیرهای سیگنالینگ مختلف، پیش آگهی ضعیف بیماری و عدم وجود روش‌های قطعی تشخیصی زودهنگام، حدود نیمی از افراد مبتلا به CRC در مرحله انتهایی تشخیص داده می‌شوند. این وضعیت بر اهمیت پیشگیری و تشخیص زودهنگام این بیماری تاکید می‌کند (۷-۴). در حال حاضر سرطان توسط سه روش اصلی جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی قابل درمان و یا بهبود می‌باشد. با وجود پیشرفت‌های درمان، در تعدادی از سرطان‌های بدخیم مانند سرطان کولورکتال، به طور مکرر مقاومت در برابر شیمی درمانی دیده می‌شود (۸). اغلب این روش‌های درمانی میان سلول‌های سالم و سرطانی تفاوتی قائل نمی‌شوند و این مسئله عوارض جانبی زیان‌آوری در بافت‌های بدن ایجاد می‌کند (۹). یکی از درمان‌های نوین سرطان، هایپرترمی است که اساس آن متمرکز کردن دمای بالا بر تومور بوده، به طوریکه سایر نقاط بدن از عوارض جانبی آن در امان بمانند. غالباً در هایپرترمی از گرمای بالای ۴۴-۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴-۲ ساعت برای از بین بردن سلول‌های توموری استفاده می‌کنند (۱۰). هایپرترمی با استفاده از یک منبع گرمای خارجی برای افزایش دمای بافت و کشتن سلول‌های سرطانی یا ممانعت از رشد بیشتر آن‌ها استفاده می‌شود (۱۱). محققان نشان داده‌اند که دمای بالا موجب از بین بردن سلول‌های سرطانی و تخریب ساختار پروتئینی سلول توموری و در نتیجه کوچک شدن سایز تومور می‌شود. زمانی‌که هایپرترمی به طور همزمان یا مدت کوتاهی بعد

▣ این مقاله حاصل پایان نامه زکیه قربانی دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۶-۰۲-۱۸۲-۳۱۴۸۵ دانشگاه علوم پزشکی ایران می باشد.
*مسئول مقاله: دکتر ابوالفضل اکبری
آدرس: تهران، خیابان ستارخان، خیابان نیایش، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، مرکز تحقیقات کولورکتال. تلفن: ۶۶۵۵۴۷۹۰-۰۲۱
E-mail: akbari.ab@iums.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]

از شروع درمان به کار گرفته شود، موجب اختلال در DNA سلول، فعال شدن پروتئین‌های شوک حرارتی و فولدینگ نامناسب پروتئین‌ها می‌شود و در نتیجه از دست دادن عملکرد سلولی و مرگ سلولی را به همراه دارد (۱۲). علیرغم پژوهش‌های دهه اخیر، مکانیسم دقیق مرگ سلولی ناشی از هایپرترمی به خوبی شناخته نشده است. به نظر می‌رسد که ترکیب هر دو عامل نکروز ناشی از گرما و غیر فعال شدن پروتئین‌های آنزیمی عوامل آسیب DNA باشند (۱۳). سلول‌های سرطانی، درجه حساسیت متفاوتی به دمای بالا نشان می‌دهند که وابسته به القای متفاوت مسیرهای بقاء دارد (۱۴).

اثربخشی شیمی درمانی یکی از مهمترین چالش‌های درمان سرطان محسوب می‌گردد. یکی از موانع عمده برای دستیابی به بهبودی طولانی مدت و درمان قطعی در بیماران مبتلا به سرطان، پروتئین مرتبط با مقاومت چند دارویی ( Multi Drug Resistant= MDR) در سلول‌های سرطانی است. مکانیسم اصلی در MDR، بیان بیش از حد انتقال دهنده‌های کاست متصل شونده به ATP بوده که توانایی افزایش خروج داروها از سلول‌های سرطانی و در نتیجه کاهش غلظت دارو درون سلولی را ایجاد می‌کند (ایفلاکس دارویی). تنظیم کننده‌های پروتئین‌های انتقال دهنده ABC، اثربخشی داروهای ضد سرطان را افزایش می‌دهند (۱۵). مقاومت به دارو یک پدیده شناخته شده است که ابتدا در مقاومت باکتری‌ها به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح شد. اما از زمانی‌که مکانیسم‌های مشابه آن در سایر بیماری‌ها از جمله سرطان شناسایی شد، مورد توجه قرار گرفت. بسیاری از انواع سرطان‌ها در ابتدا حساس به شیمی درمانی هستند ولی در طول زمان از طریق انتشار به خارج و مکانیسم‌هایی دیگر مانند جهش‌های DNA و تغییرات متابولیکی، باعث مهار و تخریب دارو شده و مقاومت ایجاد می‌کنند (۱۶).

در حالیکه انتشار از طریق ناقلین ABC یک فرآیند فیزیولوژیکی طبیعی است، اما به عنوان مکانیسم مقاومت به دارو در سلول‌های سرطانی نیز شناخته می‌شود. این ناقلین در موقعیتی قرار دارند که بتوانند سیگنال‌های داخلی و داروهای خارجی را پمپ کنند و از این طریق بر پیشرفت سرطان و مقاومت در برابر دارو تاثیر بگذارند (۱۸و۱۷). مقاومت دارویی تقریباً در تمام بیماران مبتلا به سرطان روده بزرگ، منجر به کاهش اثربخشی درمان‌های ضد سرطانی می‌شود. انواع مختلفی از ناقلین ABC از جمله MDR1 و MRP4 در سلول‌های سرطانی روده بزرگ تنظیم افزایشی دارند که موجب افلاکس داروهای ضد سرطان از سلول‌های سرطانی و کاهش اثرات درمانی آن‌ها می‌شود. از طرفی، ایجاد حساسیت سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو نسبت به داروهای ضد سرطانی، از طریق مهار انتقال دهنده‌های ABC به‌وسیله سرکوب بیان پروتئین آن‌ها یا استفاده همزمان از تعدیل کننده، اثبات شده است (۱۹).

با توجه به اهمیت مقاومت دارویی در درمان سرطان کولورکتال و نقش انتقال دهنده‌های ایفلاکس چند دارویی در مقاومت شیمی درمانی، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر احتمالی هایپرترمی بر بیان ژن‌های مربوط به فاکتورهای مقاومت دارویی، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

این مطالعه مورد- شاهدی آزمایشگاهی، تحت حمایت دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد مصوب ۳۱۴۸۵-۱۸۲-۰۲-۹۶ از کمیته اخلاق دانشگاه انجام شد.

رده‌های سلولی از بانک سلولی پاستور تهیه شد و در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco، آمریکا) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین در انکوباتور در شرایط دمای ۳۷ $^{o}C$ و ۵٪ $CO_2$ کشت داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز تعویض شد و زمانی‌که سلول‌ها ۹۰-۸۰ درصد فلاکس را پر کردند، تحت آزمایش هایپرترمی قرار گرفتند. در گروه‌های هایپرترمی، سلول‌ها در محیط RPMI به‌همراه ۱۰٪ FBS، در انکوباتوری که از قبل به دمای ۴۲ و ۴۳ درجه سانتیگراد رسیده بود، به طور جداگانه، به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. گروه کنترل برای هر رده سلولی نیز به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

**تست MTT (Microculture Tetrazolium Test):** اثر سایتوتوکسیک هایپرترمی روی سلول‌های سرطانی ذکر شده با روش رنگ سنجی MTT (BioIDEA، ایران) و با استفاده از رنگ تترازولیوم در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. برای آزمایش MTT، به صورت جداگانه، سلول‌های HT-29 و SW-48 را در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت پلیت‌ها داخل انکوباتور قرار گرفتند. درصد زنده ماندن سلولی پس از قرار گرفتن در معرض هایپرترمی بررسی شد. پس از آن، محیط کشت قبلی خارج گردید و به هر چاهک ۱۰ میکرلیتر، محلول MTT اضافه شد. سپس ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ $^{o}C$ قرار گرفت. سپس به هر چاهک ۵۰ میکرلیتر DMSO اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، میزان جذب (۶۳۰/۵۷۰ نانومتر) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek، آمریکا) اندازه گیری شد. جهت افزایش دقت آزمایش، برای هر غلظت، آزمایش به صورت سه تایی (Triplicate) انجام شد.

**استخراج RNA توتال:** استخراج RNA با استفاده از کیت (Roche، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. سپس، برای ارزیابی OD و غلظت آن‌ها از دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) استفاده گردید (نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ یک نمونه RNA خالص ۲±۰/۱ می‌باشد). همچنین، کیفیت RNA ها توسط الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ ارزیابی شدند و نهایتاً در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

**سنتز cDNA:** سنتز cDNA از RNA مناسب با استفاده از کیت معرف PrimeScript RT (Takara، ژاپن) حاوی پرایمر غیر اختصاصی – Oligo dT، رندم هگزامر، بافر 5×PrimeScript™ و آنزیم رونوشت بردار معکوس پرایم اسکریپت، طبق پروتکل سازنده انجام گرفت.

**طراحی پرایمر:** پرایمرهای مورد استفاده توسط نرم افزار GeneRunner طراحی و توسط NCBI، BLAST شدند (جدول ۱). پرایمرها توسط شرکت پیشگام سنتز شدند. گلیسیرالدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمالیزه کردن استفاده گردید.

**واکنش Quantitative real-time PCR:** برای تعیین کمی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، واکنش q-RT PCR با استفاده از کیت SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara، ژاپن) و دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific) انجام شد. در هر میکروتیوب ۱۰ میکرلیتر SYBR Premix Ex Taq II، ۰/۴ میکرولیتر رنگ ROX، ۲ میکرولیتر cDNA الگو، از هر پرایمر ۴/ میکرولیتر و ۶/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل ریخته شد. واکنش q-RT PCR در شرایط دمایی

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]

به ترتیب شامل مراحل زیر انجام گرفت: مرحله واسرشت شده ابتدایی (۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه) و ۴۰ سیکل شامل ۹۵°C به مدت ۵ ثانیه و ۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه. تمام آزمایشات به صورت تکرار های ۳ تایی انجام شد. برای ارزیابی تأثیر هایپرترمی بر تغییر شکل سلول‌ها، فنوتیپ سلولی با استفاده از میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌ها، ابتدا CTهای به دست آمده برای هر ژن توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. سپس، میانگین نتایج به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS، در هر گروه محاسبه شد. برای بررسی تفاوت بیان ژن‌های مورد نظر در حالت نرمال و تحت تیمار از آزمون Kruskall-Wallis استفاده گردید و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

**جدول ۱. توالی پرایمرها و اندازه محصول ژن‌ها**

| نام ژن | پرایمر | توالی از '۵ به '۳ (5'->3') | اندازه محصول |
|---|---|---|---|
| MDR-1 | Forward | 5´-GGGAGCTTAACACCCGACTTA-3´ | ۱۵۴ bp |
| | Reverse | 5´-GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT-3´ | |
| MRP-4 | Forward | 5´-AGCTGAGAATGACGCACAGAA-3´ | ۱۲۵bp |
| | Reverse | 5´-ATATGGGCTGGATTACTTTGGC-3´ | |
| GAPDH | Forward | 5´-CACCAGGGCTGCTTTTAAC-3´ | ۱۹۰ bp |
| | Reverse | 5´-GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT-3´ | |

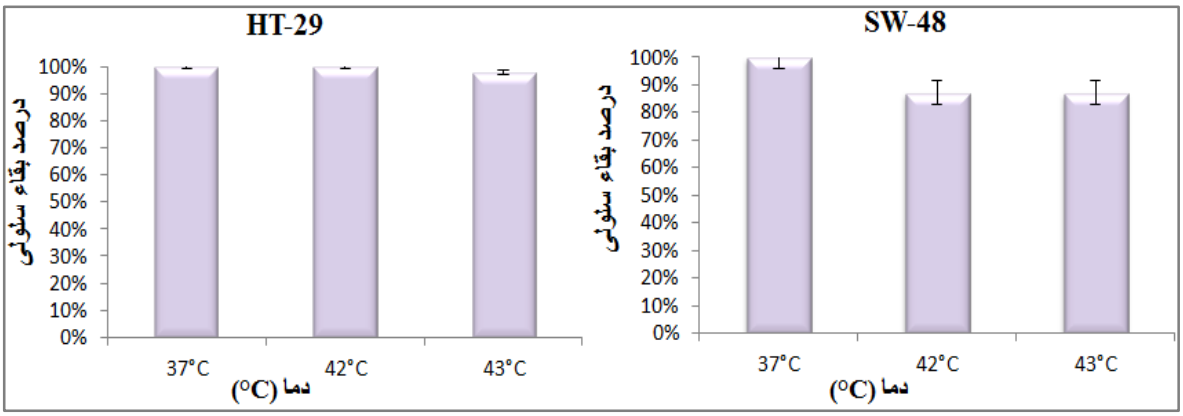
## یافته‌ها

نتایج نشان داد که هایپرترمی تاثیری بر مورفولوژی سلول ندارد.

**آزمون MTT:** زنده ماندن سلولی تحت تاثیر هایپرترمی با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. هر رده سلولی الگوی متفاوتی در پاسخ به هایپرترمی نشان می‌دهد. سلول‌های SW-48 در مقایسه با رده سلولیHT-29، حساس‌تر بوده و هنگامی که درجه حرارت از ۳۷°C به ۴۳°C افزایش می یابد درصد بقاء سلولی، کاهش بیشتری می‌یابد. با این حال، از نظر آماری این کاهش درصد بقاء رده‌های سلولی تحت تیمار با افزایش دما، معنی دار نیست (HT-29; $P_{HT}$= ۰/۴۵۲ و SW-48; $P_{SW}$= ۰/۴۷۱) (شکل ۱).

**Quantitative Real-Time PCR:** به منظور بررسی تغییرات مولکولی احتمالی که ممکن است در طول قرار گرفتن در معرض هایپرترمی اتفاق افتاده باشد، الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت دارویی با استفاده از q-RT PCR ارزیابی شد.تغییرات نسبی بیان MDR1 در سلول‌های SW-48 بر اثر هایپرترمی (۴۲ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد) نسبت به گروه کنترل (۳۷ درجه سانتی‌گراد) به تدریج کاهش یافت، این کاهش بیان با افزایش دمای ۴۳°C ارتباط معنی داری نشان داد ($P_{SW}$=۰/۰۰۷). اما در رده سلولیHT-29 الگوی بیان متفاوتی مشاهده شد. پس از کاهش بیان MDR1 در ۴۲ درجه سانتیگراد، بیان افزایشی در دمای ۴۳ درجه سانتیگراد مشاهده شد. با وجود کاهش دما در ۴۲ درجه سانتی گراد، در رده سلولی HT29 کاهش معنی دار بیان این ژن با افزایش دما مشاهده نشد ($P_{HT}$=۰/۱۸۰) (شکل ۲).

بیان ژن MRP4 در رده سلولی HT-29 تحت تاثیر دمای ۴۲ درجه سانتیگراد افزایش یافته است. از طرفی، بیان این ژن، در دمای ۴۳ درجه سانتیگراد در مقایسه با ۴۲ درجه سانتیگراد کاهش و نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد افزایش داشته است. با این وجود این تغییرات بیان از نظر آماری معنی دار نبوده است ($P_{HT}$=۰/۲۸۸). در رده سلولی SW-48 با افزایش دما، میزان بیان این ژن افزایش یافته است ولی تغییر معنی داری مشاهده نشد ($P_{SW}$=۰/۷۳۳) (شکل ۳). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، ژن‌های مرتبط با ایفلاکس دارویی در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال تحت تیمار دمایی مختلف، رفتار متفاوتی را نشان می‌دهند.

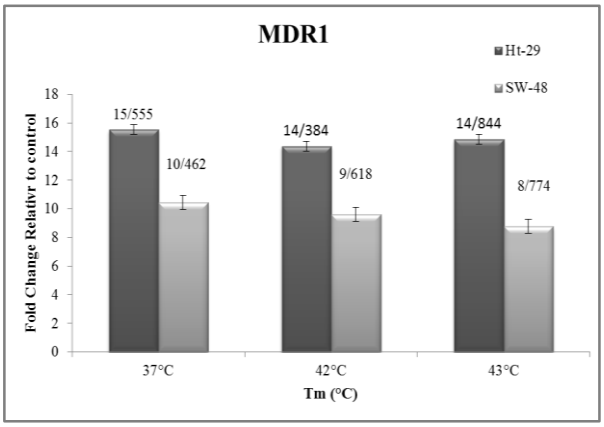



**شکل ۱. تأثیر هایپرترمی بر بقاء سلول‌های سرطانی**

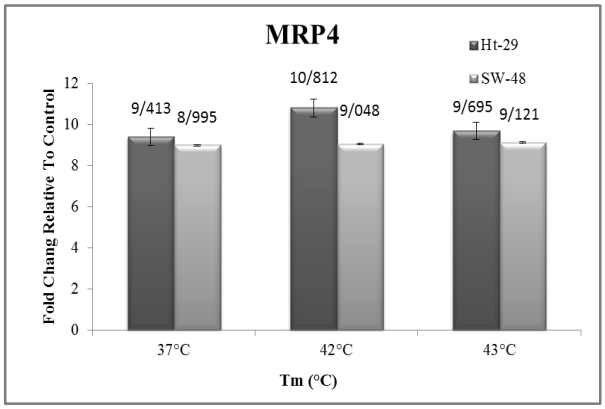
**افزایش دما تأثیر معنی‌داری بر روی بقاء سلولی نداشت.**

**همه داده‌ها با گروه کنترل مقایسه شدند (HT-29; $P_{HT}$= ۰/۴۵۲ و SW-48; $P_{SW}$= ۰/۴۷۱).**

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]




**شکل ۲. تاثیر هایپرترمی بر الگوی بیان ژنMDR1 در رده سلولی HT-29 و SW-48. در سلول‌های HT-29 با وجود کاهش بیان ژن MDR1 در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد تفاوت آماری معنی‌داری در بیان ژن MDR1 بین گروه هایپرترمی و کنترل رده سلولی HT-29 دیده نشد ($P_{HT}$=۰/۱۸۰). در رده سلولی SW-48 با افزایش دما سطح بیان بطور قابل توجهی کاهش یافته است ($P_{SW}$=۰/۰۰۷). تمام داده ها با گروه کنترل (۳۷ درجه سانتیگراد) مقایسه شدند.**




**شکل ۳. تاثیر هایپرترمی بر الگوی بیان ژن MRP4 در رده سلولی HT-29 و SW-48. افزایش دما تأثیر معنی داری بر الگوی بیان ژن MRP4 نداشت ($P_{SW}$=۰/۷۳۳ و $P_{HT}$=۰/۲۸۸). تمام داده ها با گروه کنترل (۳۷ درجه سانتیگراد) مقایسه شدند.**

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که هایپرترمی بیان ژن‌های مربوط به مقاومت دارویی را کاهش می‌دهد. با این حال، در بررسی الگوی بیان ژن‌های مقاومت دارویی در رده‌های مختلف سلولی تحت تیمار با هایپرترمی، رفتار چندگانه‌ایی مشاهده شد. ژن‌های مقاومت دارویی از زمانی‌که ارتباط بیان آن‌ها با تومورهای انسانی پس از مواجهه با شیمی‌درمانی در سرطان شناسایی شد، مورد توجه بیشتری قرار گرفتند. مطالعه‌ای که توسط To و همکارانش روی سرطان ریه انجام شد، نشان دهنده عدم تغییر بیان در سطح mRNA و تنظیم افزایشی پروتئین MDR1 در پاسخ به هایپرترمی در حضور داروهای شیمی درمانی در سلول‌های سرطانی بود. بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که هایپرترمی با افزایش بیان انتقال دهنده‌های خارج سلولی، فعالیت داروهای ضد سرطان را محدود کند. از طرفی، مشخص شده است که می‌توان با استفاده از مهار کننده‌های ATPase ها، فعالیت این انتقال دهنده‌ها را تعدیل کرد (۲۰).

Norris و همکارانش نشان دادند بین افزایش MRP4 و پیش آگهی تومور در بیماران مبتلا به نوروبلاستوم اولیه ارتباط وجود دارد. به صورتیکه، بیان بالای MRP4 با تقویت انکوژن MYCN و نتایج بالینی وخیم همراه است. از این رو MRP4 یک نشانگر پیش آگهی مفید برای نوروبلاستوما معرفی شد (۲۱). Zhang و همکارانش دریافتند، بیان ژنMRP4 در سلول‌های سرطانی زیاد و در سلول‌های طبیعی ناچیز است. آن‌ها با استفاده از RNA مداخله‌گر برای کاهش بیان MRP4 در سلول‌های سرطانی معده مقاوم به دارو باعث افزایش آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در مرحله G1 شدند. در نتیجه افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی معده به داروهای شیمی درمانی را مشاهده کردند (۲۲). همچنین مطالعه Stein و همکارانش نشان داد، ترکیبی از هایپرترمی (۴۰ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد، زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه) و درمان دارویی به‌طور موثر باعث کاهش بقای سلول‌های HCT15 و HCT116 سرطان کلورکتال می‌شود. با این حال، در سطح mRNA در هر دو رده سلولی افزایش بیان MDR1 و MRP1 مشاهده شد (۲۳). نتایج مطالعه Cao و همکارانش نشان دهنده افزایش اثر MRP1 به مقاومت سلولی CRC به آپوپتوز بود. بنابراین، مهارMRP1، استراتژی جدیدی برای غلبه بر مقاومت دارویی در CRC محسوب گردید (۲۴).

در دهه گذشته، استفاده از هایپرترمی به منظور افزایش کارآیی روش‌های درمانی دیگر مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۲۵). زیرا این روش عملکرد تهاجمی کمی دارد و سلول‌های عادی را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد و روی فرآیندهای بیولوژیکی بی شماری در سلول‌ها از جمله تکثیر، مهاجرت، تهاجم و آپوپتوز تأثیر می‌گذارد (۲۷و۲۶). مطالعات گذشته نشان داده اند که هایپرترمی بر بقاء و بیان ژن‌ها در سلول‌های سرطانی تاثیرگذار است.

نتایج این مطالعه نشان داد که هایپرترمی بیان ژن MDR1 را در سلول‌های SW-48 کاهش می‌دهد ولی تاثیر معنی‌داری روی بیان ژن MRP4 در رده‌های سلولی SW-48 و HT-29 ندارد. همچنین نتایج ما نشان داد که هایپرترمی باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های SW-48 می‌شود اما این اثر معنی‌دار نبود. همانطور که گفته شد، هایپرترمی می‌تواند بر طیف گسترده‌ای از فرآیندهای سلولی از جمله متابولیسم سلولی، سنتز پروتئین، سنتز اسید نوکلئیک و پلیمریزاسیون DNA/RNA تأثیر بگذارد (۲۸) و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) را فعال کند (۲۹).

Kievit و همکارانش، تاثیر مثبت هایپرترمی بر آزاد سازی دارو از نانوذرات در سرطان‌های مقاوم به درمان را نشان دادند. به این صورت که نانوذرات در پاسخ به محرک خارجی (هایپرترمی) داروی محصور شده در خود را آزاد می‌کنند و موجب از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌گردند (۳۰). بنابراین، یکی از دلایلی که ما در این مطالعه تأثیر معنی داری از هایپرترمی بر بقاء سلولی مشاهده نکردیم می‌تواند استفاده از هایپرترمی معمولی، درجه حرارت پایین یا قرار گرفتن در معرض هایپرترمی کوتاه مدت باشد. همچنین در راستای تکمیل مطالعات گذشته و نقش مهم MDR1 و MRP4 در مقاومت دارویی و روند درمان سرطان کولورکتال، اثر هایپرترمی را روی الگوی بیان ژن‌های مقاومت دارویی ارزیابی کردیم. پژوهش حاضر نشان داد که هایپرترمی، یکی از فاکتورهای متغییر و مهم در درمان، مدت زمان گرما دهی به سلول است. طی بررسی انجام شده مشخص گردید، مدت زمان

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]

۲ ساعت برای استفاده از هایپرترمی به تنهایی، جهت نابودی سلول‌های سرطانی کولورکتال کوتاه بوده است. افزایش زمان گرمادهی و یا به کار بردن روش‌های ترکیبی درمانی می‌تواند موثر واقع شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن MDR1 تحت تاثیر هایپرترمی کاهش می‌یابند و می‌تواند همراه با روش‌های درمانی دیگر باعث حساسیت بیشتر و مرگ سلول‌های سرطانی شود. از طرف دیگر، افزایش دما و زمان گرما دهی می‌تواند بر ژن MRP4 و دیگر ژن‌های خانواده ABC به‌عنوان اهداف درمانی، تاثیر گذار باشد. با این حال، مکانیسم‌های مولکولی مهم هایپرترمی در مقاومت درمانی باید به طور کامل مورد بررسی قرار گیرد. مطالعه ما نشان داد که هایپرترمی تأثیر معنی داری روی بقاء سلولی نداشته است اما باعث کاهش بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت دارویی می شود.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش ما را یاری کردند، تقدیر و تشکر می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]

# The Effect of Hyperthermia on the Gene Expression of MDR1 and MRP4 Drug Efflux in Colorectal Cancer Cells

**Z. Ghorbani (PhD)[1], M. Heidari (PhD)[2], M. Jafarinia (PhD)[1], M. Rohani (PhD)[3], A. Akbari (PhD)[*4]**

1.Department of Molecular Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, I.R.Iran

2.Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

3.Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R.Iran

4.Colorectal Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

**J Babol Univ Med Sci; 22; 2020; PP: 388-395**

**Received: May 20th 2020, Revised: Aug 25th 2020, Accepted: Sep 5th 2020.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Hyperthermia has been reported as a new and adjunctive treatment of cancer in inhibiting DNA repair, increasing radiation sensitivity of cancer stem cells, increasing the sensitivity of drug-resistant cancer cells, and inhibiting cancer signaling pathways that cause apoptosis, suppression of cancer stem cell proliferation and disruption in cellular function. The aim of this study was to investigate the effect of hyperthermia on the gene expression pattern of drug resistance and cell survival.

**METHODS:** In this in vitro study, two cell lines of human colorectal adenocarcinoma HT-29 and SW-48 were cultured. The cells of the hyperthermia and control groups were exposed to 42 or 43 °C and 37 °C for 2 hours, respectively. Then the effect of hyperthermia on cell survival was investigated by MTT method. The expression pattern of MDR1 and MRP4 genes was also measured using qRT-PCR.

**FINDINGS:** Hyperthermia reduced cell survival, but this reduction was not significant. Hyperthermia decreased MDR1 gene expression in SW-48 cells (p=0.007). Although MDR1 expression in HT-29 cells was significantly reduced at 42 °C, no significant difference was observed between the hyperthermia and control groups. Hyperthermia also had no significant effect on MRP4 gene expression in SW-48 and HT-29 cell lines.

**CONCLUSION:** The results showed that hyperthermia reduces the gene expression related to drug resistance, but has no significant effect on cell survival.

**KEY WORDS:** *Drug Resistance Genes, Colorectal Cancer, Gene Expression, Hyperthermia, Tumorigenesis.*

**Please cite this article as follows:**

Ghorbani Z, Heidari M, Jafarinia M, Rohani M, Akbari A. The Effect of Hyperthermia on the Gene Expression of MDR1 and MRP4 Drug Efflux in Colorectal Cancer Cells. J Babol Univ Med Sci. 2020; 22: 388-95.

[*]**Corresponding Author: A. Akbari (PhD)**

**Address:** Colorectal Research Center, Hazrate Rasoole Akram Hospital, Niayesh Street, Satarkhan Avenue,Tehran, I.R.Iran

**Tel:** +98 21 66554790

**E-mail:** akbari.ab@iums.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]

[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]

## References

1.Akbari A, Mobini GR, Maghsoudi R, Akhtari J, Faghihloo E, Farahnejad Z. Modulation of transforming growth factor-β signaling transducers in colon adenocarcinoma cells induced by staphylococcal enterotoxin B. JMmr. 2016;13(1):909-14.

2.Moghadamnia F, Ghoraeian P, Minaeian S, Talebi A, Farsi F, Akbari A. MicroRNA Expression and Correlation with mRNA Levels of Colorectal Cancer-Related Genes. JJoGC. 2020;51(1):271-9.

3.Emami SS, Akbari A, Zare A-A, Agah S, Masoodi M, Talebi A, et al. MicroRNA expression levels and histopathological features of colorectal cancer. J Gastrointest Cancer. 2019;50(2):276-84.

4.Agah S, Akbari A, Talebi A, Masoudi M, Sarveazad A, Mirzaei A, et al. Quantification of plasma cell-free circulating DNA at different stages of colorectal cancer. Mol Med Rep. 2017;35(10):625-32.

5.Salehizadeh S, Hasanzad M, Kadijani AA, Akbari A. The Expression Analysis of Intestinal Cancer Stem Cell Marker Lgr5 in Colorectal Cancer Patients and the Correlation with Histopathological Markers. JJogc. 2019:1-9.

6.Eslamizadeh S, Heidari M, Agah S, Faghihloo E, Ghazi H, Mirzaei A, et al. The role of MicroRNA signature as diagnostic biomarkers in different clinical stages of colorectal Cancer. Cell J. 2018;20(2):220.

7.Abedini P, Fattahi A, Agah S, Talebi A, Beygi AH, Amini SM, et al. Expression analysis of circulating plasma long noncoding RNAs in colorectal cancer: The relevance of lncRNAs ATB and CCAT1 as potential clinical hallmarks. J Cell Physiol. 2019;234(12):22028-33.

8.Kim J-E, Shin J-Y, Cho M-H. Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects. Arch Toxicol. 2012;86(5):685-700.

9.Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals: World Scientific. 2010. p. 239-50.

10.Pankhurst N, Porter M. Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction. Fish Physiol Biochem. 2003;28(1-4):385-9.

11.Hegyi G, Szigeti GP, Szász A. Hyperthermia versus oncothermia: cellular effects in complementary cancer therapy. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013.

12.Lutgens L, van der Zee J, Pijls-Johannesma M, De Haas-Kock DF, Buijsen J, van Mastrigt GA, et al. Combined use of hyperthermia and radiation therapy for treating locally advanced cervix carcinoma. Cochrane Database Syst Rev. 2010(3).

13.Mallory M, Gogineni E, Jones GC, Greer L, Simone II CB. Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;97:56-64.

14.Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. GCR. 2012;5(1):19.

15.Petti M, Samanich J, Pan Q, Huang CK, Reinmund J, Farooqi S, et al. Molecular characterization of an interstitial deletion of 1p31. 3 in a patient with obesity and psychiatric illness and a review of the literature. AJMG Part A. 2011;155(4):825-32.

16.Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. Cancers. 2014;6(3):1769-92.

17.Wen J, Luo J, Huang W, Tang J, Zhou H, Zhang W. The pharmacological and physiological role of multidrug-resistant protein 4. J Pharmacol Exp Ther. 2015;354(3):358-75.

18.Ahlin G, Hilgendorf C, Szigyarto CA-K, Uhlen M, Karlsson JE, Artursson P. Endogenous gene and protein expression of drug transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs. Drug Metab Dispos. 2009.

19.Hu T, Li Z, Gao C-Y, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. JWjog. 2016;22(30):6876.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]

20.To KK, Poon DC, Wei Y, Wang F, Lin G, Fu L. Pelitinib (EKB-569) targets the up-regulation of ABCB1 and ABCG2 induced by hyperthermia to eradicate lung cancer. Br. J. Pharmacol. 2015;172(16):4089-106.
21.Norris MD, Smith J, Tanabe K, Tobin P, Flemming C, Scheffer GL, et al. Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. Mol Cancer Ther. 2005;4(4):547-53.
22.Zhang G, Wang Z, Qian F, Zhao C, Sun C. Silencing of the ABCC4 gene by RNA interference reverses multidrug resistance in human gastric cancer. Oncol Rep. 2015;33(3):1147-54.
23.Stein U, Jürchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM, Royer H-D. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. JJoBC. 2001;276(30):28562-9.
24.Cao D, Qin S, Mu Y, Zhong M. The role of MRP1 in the multidrug resistance of colorectal cancer. JOl. 2017;13(4):2471-6.
25.Asili M, Chen P, Demirci U, Topsakal E, editors. Microwave mild-hyperthermia for the chemo-thermotherapy of the breast. 2015 USNC-URSI Radio Science Meeting (Joint with AP-S Symposium); 2015: IEEE.
26.Zhou J, Wang X, Du L, Zhao L, Lei F, OuYang W, et al. Effect of hyperthermia on the apoptosis and proliferation of CaSki cells. Mol Med Rep. 2011;4(1):187-91.
27.Oei AL, Vriend LE, Crezee J, Franken NA, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. JRO. 2015;10(1):165.
28.Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. JCsc. 2014;14(3):275-91.
29.Lin F-C, Hsu C-H, Lin Y-YJIjon. Nano-therapeutic cancer immunotherapy using hyperthermia-induced heat shock proteins: insights from mathematical modeling. Int.J.Nanomed. 2018;13:3529.
30.Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. J Control Release. 2011;152(1):76-83.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1399.22.1.54.6 ]
[ DOI: 10.22088/jbums.22.1.388 ]