

Cytotoxic effects of all-trans-retinoic acid with cisplatin on esophageal cancer cell line (KYSE-30)

Abbasi A¹, Amani M^{2*}, Najafzadeh N³, Mazani M⁴

1-Department of Biochemistry, Ardabil University of Medical Sciences, Medical Faculty, Ardabil, Iran

2- Department of Biophysics, Ardabil University of Medical Sciences, Medical Faculty, Ardabil, Iran

3- Department of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Medical Faculty, Ardabil, Iran

4- Department of Biochemistry, Ardabil University of Medical Sciences, Medical Faculty, Ardabil, Iran

Received: 21 Sep 2013, Accepted: 31 Dec 2013

Abstract

Background: All-trans retinoic acid (ATRA), an active metabolite of vitamin A, is widely used for induction of differentiation, growth and proliferation of epithelial cells. Anticancer drug cisplatin induces apoptosis by cross-linking to DNA that it is commonly used for treatment of ovarian, head and neck, esophageal, and gastric cancers and melanoma. Previous studies on ovarian cancer and melanoma cell lines, suggesting additive effects of retinoic acid with cisplatin. The present study is the first study on simultaneous effects of all-trans retinoic acid and cisplatin on human esophageal cancer cell line KYSE-30.

Material and Methods: In this experimental study, KYSE-30 cell line was cultured in presence of different concentration of ATRA alone and in combination with cisplatin. Then, cell death was investigated by clonogenic assay and acridine orange/ ethidium bromide staining.

Results: The results showed that ATRA concentrations $\geq 15\mu\text{M}$ cause differentiation of KYSE30 to squamous cell morphology, while lower concentrations decreases the colony formation ($p \leq 0.05$). The best effects on cell death were observed in $10\mu\text{M}$ of ATRA of combination with 5 and $10\mu\text{g/ml}$ of cisplatin.

Conclusions: Concomitant use of low concentrations of retinoic acid and cisplatin increases apoptosis and necrosis, thus reducing the number of cell line KYSE-30 colonies compared with cisplatin alone.

Keywords: all-trans-Retinoic Acid, Cisplatin, Esophageal Neoplasm

*Corresponding author:

Address: Department of Biophysics, Ardabil University of Medical Sciences, Medical faculty, Ardabil, Iran

Email: n.najafzade@arums.ac.ir

بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس با سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطان مری (KYSE-30)

اسدالله عباسی¹، مجتبی امانی^{2*}، نوروز نجف زاده³، محمد مازنی⁴

1. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
2. دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
3. استادیار، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
4. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: 92/6/30 تاریخ پذیرش: 92/10/11

چکیده

زمینه و هدف: رتینوئیک اسید تمام ترانس به عنوان یکی از متابولیت‌های ویتامین A در القای تمایز، رشد و تکثیر سلول‌های اپیتلیالی نقش دارد. داروی ضد سرطان سیس پلاتین با اتصال متقاطع به DNA موجب القای آپوپتوز می‌شود که در درمان سرطان‌های تخمدان، سر و گردن، مری، معده و ملانوما استفاده می‌شود. مطالعات قبلی بر روی برخی رده‌های سلولی سرطان تخمدان و ملانوما بیانگر اثرات افزایشی رتینوئیک اسید با سیس پلاتین می‌باشد. مطالعه حاضر اولین مطالعه در مورد اثرات هم‌زمان رتینوئیک اسید تمام ترانس و سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطان مری KYSE-30 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی (مداخله‌ای)، رده سلولی KYSE30 در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید و ترکیب آن با سیس پلاتین کشت داده شد، سپس مرگ سلولی با روش‌های شمارش کلونی و رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج حاکی از القاء تمایز سلولی در رقت‌های ≥ 15 میکرومولار رتینوئیک اسید است. رقت‌های پائین‌تر رتینوئیک اسید، باعث مرگ سلولی و کاهش تعداد کلونی در حضور و نیز عدم حضور سیس پلاتین گردید ($p < 0/05$). ترکیب 10 میکرومولار رتینوئیک اسید با 5 و 10 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین بهترین اثر را در کاهش تعداد کلونی و افزایش مرگ سلولی نشان داد.

نتیجه گیری: استفاده هم‌زمان از رقت‌های پایین رتینوئیک اسید و سیس پلاتین باعث افزایش آپوپتوز و نکروز و در نتیجه کاهش تعداد کلونی رده سلولی KYSE30 در مقایسه با سیس پلاتین به تنهایی می‌شود.

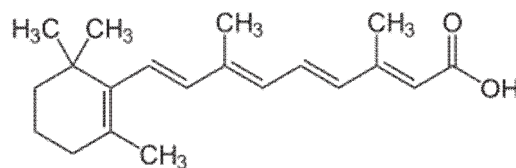
واژگان کلیدی: رتینوئیک اسید تمام ترانس، سیس پلاتین، سرطان مری

*نویسنده مسئول: اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه بیوفیزیک

Email: n.najfzade@arums.ac.ir

مقدمه

رتینوئیک اسید تمام ترانس (All-trans Retinoic Acid) با فرمول شیمیایی $C_{20}H_{28}O_2$ ، یکی از متابولیت‌های فعال ویتامین A است (شکل 1) که در پلاسما به پروتئین اتصال رتینول (Retinol binding protein) و آلبومین متصل می‌شود. غلظت فیزیولوژیک آن در پلاسمای انسان 14-4 نانومول در لیتر می‌باشد (1، 2). رتینوئیک اسید تمام ترانس با انتشار ساده وارد سلول شده و به گیرنده داخل هسته‌ای متصل می‌شود و دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای بر روی رشد، تمایز و آپوپتوز سلول‌های اپی تلیالی سالم، پیش سرطانی و سرطانی است. اثرات رتینوئیک اسید تمام ترانس به واسطه‌ی دو گروه از گیرنده‌های داخل هسته‌ای، گیرنده رتینوئیک اسید (RARs) و گیرنده رتینوئیدی X (RXRs) انجام می‌گیرد که متعلق به فرآیند خانواده استروئید/ تیروئید هستند که به وسیله سه ژن مختلف آلفا، بتا و گاما رمزدهی می‌شوند.

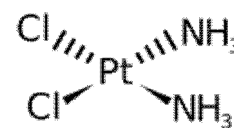


شکل 1. ساختار فضایی رتینوئیک اسید

رتینوئیک اسید فاکتور مهم در تکامل جنین و در سازماندهی محور قدامی-خلفی و پشتی-شکمی جنین می‌باشد. رتینوئیدها اثرات ضد سرطانی بر روی برخی از سرطان‌های انسان از جمله سرطان سلول سنگ فرشی اپیتلیالی دهان نشان می‌دهند و در مطالعات بالینی، 13-سیس رتینوئیک اسید باعث سرکوب و جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی اپی تلیالی شده و مانع از تشکیل تومورهای ثانویه در افراد مبتلا به سرطان سلول سنگ فرشی می‌شود. در سال 1980 بریتمن و همکارانش نشان دادند که

رتینوئیک اسید تمام ترانس باعث تمایز و بالغ شدن رده سلولی لوسمی می‌شود و غلظت 1 میکرومول در لیتر آن در رده سلولی HL-60 (رده سلولی سرطان لوسمی) منجر به تمایز و کاهش قدرت تکثیر آن تا 95 درصد می‌شود و در حال حاضر نیز رتینوئیک اسید تمام ترانس در درمان لوسمی پرومیلوسیت حاد استفاده می‌شود. اثرات رتینوئیک اسید تمام ترانس در رده سلولی لوسمی به واسطه کاهش بیان ژن c-myc و سیکلین E بوده که باعث آغاز یک سری از وقایع، که منجر به توقف چرخه سلولی می‌گردد (3).

سیس پلاتین یکی از ترکیبات غیر ارگانیک با فرمول شیمیایی H_2PtCl_2 است (شکل 2) که با اتصال متقاطع به DNA باعث مهار DNA سنتتاز، توقف چرخه سلولی در مرحله G2/M و القاء آپوپتوز سلول‌ها می‌شود (4) که در درمان کارسینوم سلول سر و گردن (5)، سرطان تخمدان و ملانوما استفاده می‌شود. هر چند سیس پلاتین اثر خوبی روی برخی سرطان‌ها (مانند سرطان تخمدان و معده و ملانوما) دارد اما اثر تخریبی غیر قابل برگشت روی کلیه‌ها می‌گذارد و از عوارض جانبی آن شامل اثرات توکسیکی روی کلیه‌ها، آسیب عصبی، ریزش موها، اختلال در تعادل الکترولیت‌ها، آنمی همولیتیک و سرکوب مغز استخوان می‌باشد و به علت این اثرات توکسیکی استفاده از آن محدود می‌باشد، بنابر این می‌توان با کاهش اثرات جانبی و افزایش سطح دارو عملکرد آن را بهبود بخشید. اخیراً مقاومت نسبت به سیس پلاتین در برخی تومورها از جمله تخمدان و معده افزایش پیدا کرده است. مکانیسم‌های مختلفی در ایجاد مقاومت نقش دارد که مهم‌ترین آنها افزایش بیان پروتئین ضد آپوپتوتیک Bcl-2 در سلول‌های توموری می‌باشد.



شکل 2. ساختار فضایی سیس پلاتین

سلولی در برخی از رده‌های سلولی سرطان معده انسان مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات رتینوئیک اسید تمام ترانس و ترکیب آن با سیس پلاتین بر روی مرگ و میر رده سلولی سرطان سلول سنگ فرشی مری انسان (KYSE-30) انجام یافت.

مواد و روش‌ها

سیس پلاتین و رتینوئیک اسید تمام ترانس از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شد و سیس پلاتین در محلول فسفات سالین (Phosphate buffer saline- PBS) حل شد و برای تهیه غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید این ماده در دی متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide-DMSO) حل شد.

در این مطالعه تجربی (مداخله‌ای)، برای بررسی تاثیر رتینوئیک اسید بر سلول‌های سرطان سنگ فرشی مری (KYSE-30)، سلول‌ها در حضور غلظت‌های بین 5-30 میکرومولار رتینوئیک اسید به مدت هفت روز کشت داده شدند. مطالعات قبلی نشان داده است که رتینوئیک اسید در غلظت‌های بالا باعث القای تمایز سلولی می‌شود (11).

برای بررسی اثر تیمار هم‌زمان با سیس پلاتین و رتینوئیک اسید بعد از هفت روز تیمار با رتینوئیک اسید به مدت سه روز نیز با 5 یا 10 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین تیمار گردید. مطالعات قبلی نشان داده در غلظت‌های پایین رتینوئیک اسید و سیس پلاتین اثرات سمیت بیشتری روی سلول‌های سرطانی دارد (7). بر این اساس 13 گروه به شرح جدول 1 مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌های انجام شده در استفاده از ترکیب درمانی سیس پلاتین و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی سرطان‌های مختلفی از جمله رده سلولی سرطان تخمدان، رده سلولی سرطان سر و گردن و سرطان سلول پوست انسان نشان می‌دهد که ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس و سیس پلاتین باعث مهار قابل ملاحظه‌ی رشد سلول‌های سرطانی شده است که نشان دهنده پتانسیل درمانی آن است (6، 7). شالینسکی و همکارانش با بررسی اثرات 9- سیس رتینوئیک اسید بر روی تومورهای گزینوگرافت ناشی از سرطان دهان انسان بر روی موش در ترکیب با سیس پلاتین نشان دادند که 9- سیس رتینوئیک اسید باعث افزایش اثرات سیتوتوکسیکی سیس پلاتین بدون تغییر مکانیسم عمل و رقت دارویی آن می‌شود (8). سرطان مری هشتمین سرطان شایع و ششمین علت منجر به مرگ ناشی از سرطان‌ها بوده و از نظر بافت شناسی می‌توان آن را به دو نوع آدنوکارسینوما و کارسینوم سلول سنگ فرشی تقسیم کرد که نوع کارسینوم سلول سنگ فرشی آن شایع‌تر می‌باشد که فاکتورهای موثر در بروز آن نیز مصرف دخانیات، الکل و بیماری بارترز می‌باشد. استان اردبیل نیز در حال حاضر از شایع‌ترین مناطق بروز سرطان مری و معده در ایران و جهان می‌باشد و از بین تمام سرطان‌های رایج، میزان شیوع سرطان معده و مری در این استان 1/3 کل سرطان‌ها را شامل می‌شود (9، 10). لذا با توجه به یافته‌های اخیر مبنی بر اثرات مهاری رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی رشد و چرخه

جدول 1. گروه‌هایی که برای درمان استفاده شد

| ردیف | گروه‌ها | تیمار |
|------|-------------|--|
| 1 | کنترل | محیط کشت |
| 2 | RA5 | رتینوئیک اسید 5 میکرومولار |
| 3 | RA10 | رتینوئیک اسید 10 میکرومولار |
| 4 | RA15 | رتینوئیک اسید 15 میکرومولار |
| 5 | RA20 | رتینوئیک اسید 20 میکرومولار |
| 6 | RA30 | رتینوئیک اسید 30 میکرومولار |
| 7 | RA5+CDDP5 | رتینوئیک اسید 5 میکرومولار و سیس پلاتین 5 میکروگرم |
| 8 | RA5+CDDP10 | رتینوئیک اسید 5 میکرومولار و سیس پلاتین 10 میکروگرم |
| 9 | RA10+CDDP5 | رتینوئیک اسید 10 میکرومولار و سیس پلاتین 5 میکروگرم |
| 10 | RA10+CDDP10 | رتینوئیک اسید 10 میکرومولار و سیس پلاتین 10 میکروگرم |
| 11 | CDDP5 | سیس پلاتین 5 میکروگرم |
| 12 | CDDP10 | سیس پلاتین 10 میکروگرم |
| 13 | DMSO | دی متیل سولفواکساید |

RA, DMSO و CDDP به ترتیب مخفف رتینوئیک اسید، دی متیل سولفواکساید و سیس پلاتین می‌باشد.

اورنج و اتیدیوم بروماید (Acridine Orange/Ethidium Bromide) به سلول‌ها اضافه شد و 5 دقیقه بعد تصاویر میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت مدل olympus تهیه گردید. سلول‌های آپوپتوتیک، هسته‌ی آنها متراکم و قطعه قطعه شده و به راحتی از سلول‌های طبیعی قابل تشخیص می‌باشند به علاوه با این روش می‌توان سلول‌های آپوپتوتیک اولیه (Early apoptotic) با هسته‌ی متراکم سبز کم رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم را از سلول‌های آپوپتوتیک تاخیری (Late apoptotic) با هسته متراکم قرمز فلوروسنت و قطعه قطعه شده تشخیص داد. سلول‌های نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و یک دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص می‌باشند، سلول‌های سالم با رنگ سبز پررنگ قابل تشخیص می‌باشند.

رده سلولی KYSE-30 از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI-1640 حاوی 10 درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum-FBS) و 1 درصد محلول آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین (Gibco) کشت داده شد و در انکوباتور تحت دمای 37 درجه سانتی گراد و 5 درصد CO2 نگهداری شد.

سلول‌های رده KYSE-30 در فلاسک‌های t25 کشت داده شدند سپس سلول‌ها با تریپسین جدا شده بعد از سانتریفوژ (دور 1700 به مدت 10 دقیقه)، تعداد 12000 سلول در هر پلیت شش خانه (2000 سلول در هر خانه) کشت داده شد و با رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید و سیس پلاتین تیمار شدند (هفت روز با رتینوئیک اسید و سپس سه روز با سیس پلاتین برای گروه تیمار ترکیبی). سپس نیم میلی‌لیتر محلول حاوی 100 میلی‌گرم اکریدین

(ANOVA) و تست تکمیلی (Tukey) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج آزمون‌ها با انحراف معیار نشان داده شده است.

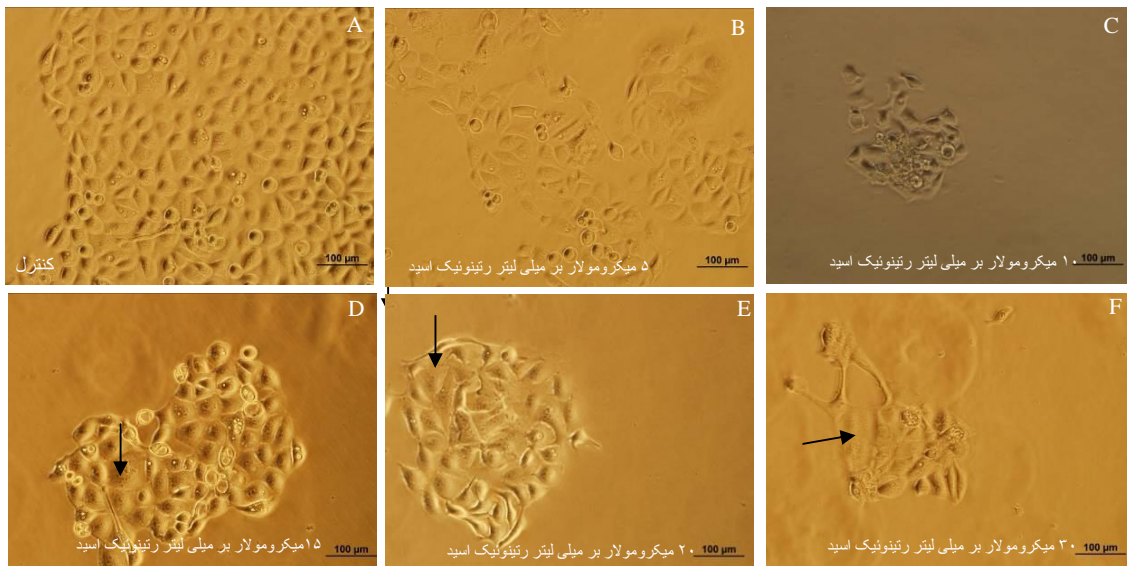
یافته‌ها

تمایز سلول‌های تیمار شده با رتینوئیک اسید

بررسی حاصل از میکروسکوپ فاز معکوس به صورت کیفی نشان داد که رقت‌های ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار باعث ایجاد مورفولوژی کشیده و پهن در سلول‌های KYSE-30 و به عبارت دیگر موجب تمایز به سلول‌های اپیتلیوم سنگ فرشی گردید (شکل 3). سلول‌ها تغییری از لحاظ مورفولوژی در حضور رقت‌های کمتر از 10 میکرومولار رتینوئیک اسید نشان ندادند. همان‌طور که انتظار می‌رفت سیس پلاتین هیچ تأثیری بر تمایز و تغییر مورفولوژی سلولی نداشت (داده‌ها نمایش داده نشده‌اند).

برای ارزیابی کلونی سلولی، ابتدا سلول‌ها تریسپینه شده و کلونی‌های سلولی با چند بار پیچاندن جدا شد و تعداد 12000 سلول را در 6 میلی‌لیتر محیط کشت حل کرده و در پلیت شش خانه به تعداد 2000 سلول در هر خانه کشت داده شد. سپس سلول‌ها به مدت یک شب انکوبه شده تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس سلول‌ها در معرض رقت‌های 5، 10، 15، 20 و 30 میکرومولار رتینوئیک اسید تمام ترانس قرار داده شد و بعد از 10 روز از کلونی‌های سلولی تصاویری با میکروسکوپ تمایز فاز معکوس (Inverted Phase contrast microscope) تهیه شد و تمایز سلولی در کلونی‌ها (بر اساس شکل ظاهری) مورد بررسی قرار گرفت و بعد از آن سلول‌ها با کریستال ویوله 0/5 درصد (که در متانول 20 درصد حل شده است) رنگ آمیزی شد و تصاویری از هر خانه پلیت شش خانه تهیه شد و کلونی‌های بیش از 50 سلول با برنامه ایمج جی (Image-j) شمارش شدند.

تمامی اطلاعات با نرم افزار آماری SPSS نسخه 16 و تست‌های آماری آنالیز واریانس (One-way

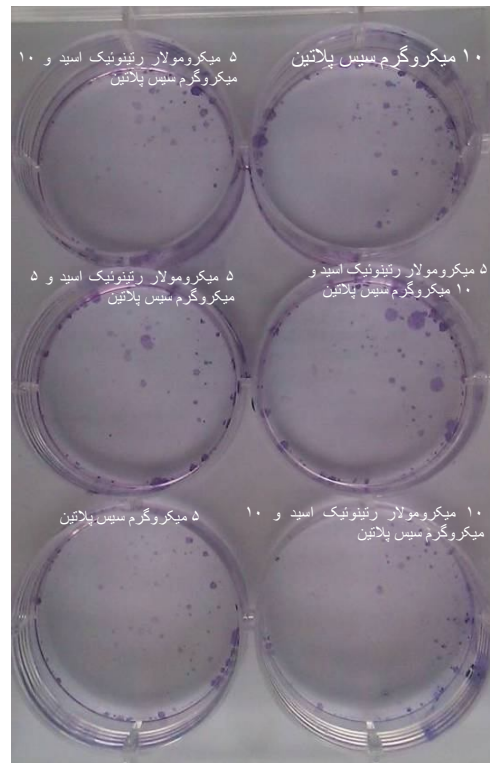
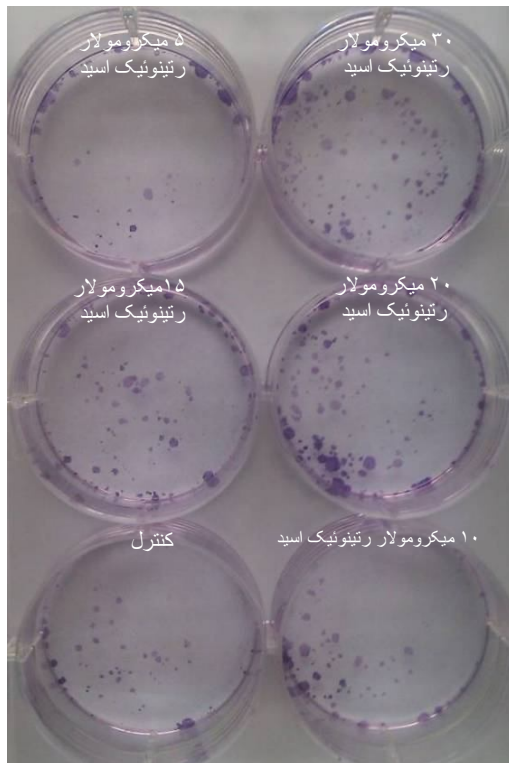


شکل 3. گروه کنترل که تمایزی را نشان نمی‌دهد. B, C. گروهی که با غلظت‌های 5 و 10 میکرومول بر میلی‌لیتر رتینوئیک اسید تیمار شده بود اثرات تمایز را نشان نداد. D, E, F. گروهی که به ترتیب با رقت‌های ۱۵، ۲۰ و 30 میکرومولار رتینوئیک اسید تیمار شده بودند اثرات تمایزی را از خود نشان می‌دادند. نوک فلش سلول‌های متمایز شده سنگ فرشی را بعد از تیمار با رقت‌های 15، 20 و 30 میکرومولار رتینوئیک اسید را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی ×200).

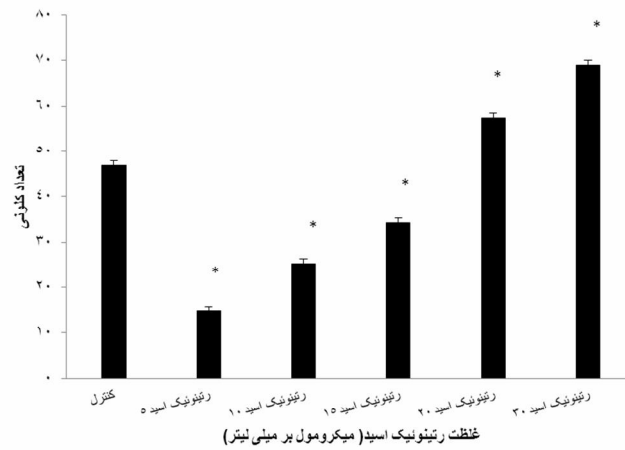
ارزیابی کلونی‌ها

نتایج حاکی از آن است که رقت‌های 5 و 10 میکرومولار رتینوئیک اسید به طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش تعداد کلونی نسبت به گروه کنترل ($p < 0/05$) گردیده در حالی که رقت‌های بالاتر این ماده باعث افزایش تعداد کلونی‌ها نسبت به گروه کنترل ($p < 0/05$) شده است (نمودار 1). هم‌چنین بررسی کلونی‌ها از نظر اندازه ظاهری در غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید بیان‌گر آن است که غلظت‌های کمتر از 10 میکرومولار این ماده موجب کاهش اندازه کلونی ولی غلظت‌های بالاتر از 10 میکرومولار موجب افزایش اندازه کلونی شده است (شکل 4). سیس پلاتین 10 و 5 میکروگرم در میلی‌لیتر نیز باعث

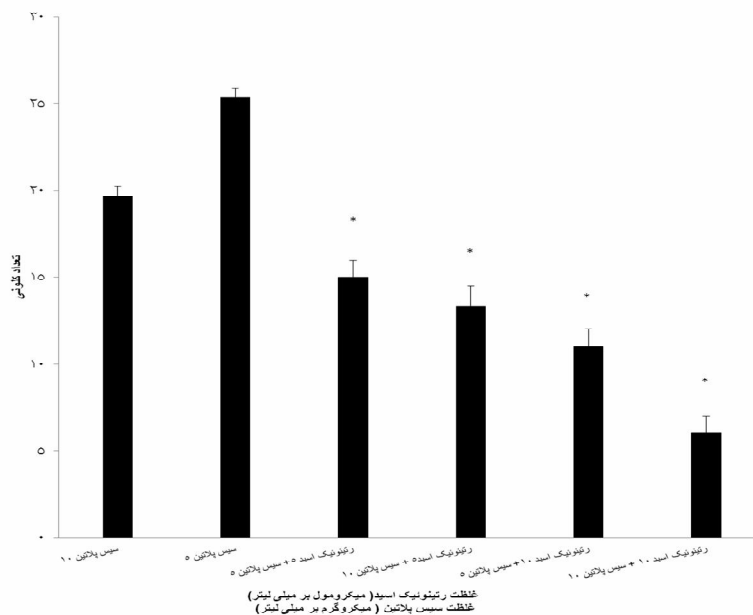
کاهش تعداد کلونی و اندازه آنها نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0/05$) (شکل 4 و نمودار 2). هم‌چنین ترکیب تیمار با 5، 10 میکرومولار رتینوئیک اسید با 5 و 10 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین باعث کاهش قابل ملاحظه‌ی تعداد و اندازه کلونی‌ها نسبت به حالت استفاده به تنهایی از داروها شد و ترکیب تیمار رتینوئیک اسید 10 میکرومولار با سیس پلاتین 10 میکروگرم در میلی‌لیتر بیش‌ترین اثر را در کاهش تعداد کلونی‌ها نشان می‌داد و مقایسه اختلاف میانگین گروه‌های ترکیبی نسبت به گروه‌های 10 و 5 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین کمتر از 0/05 می‌باشد ($p < 0/05$) (شکل 4 و نمودار 2).



شکل 4. کلونی‌های سلولی تشکیل شده بعد از تیمار سلول‌های سرطانی رده مری (KYSE30) با رتینوئیک اسید و سیس پلاتین، (A) تعداد و اندازه کلونی‌ها را بعد از تیمار با رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید نشان می‌دهد (B). تعداد و اندازه کلونی را بعد از تیمار با رتینوئیک اسید و سیس پلاتین نشان می‌دهد که در رقت 10 میکرومولار رتینوئیک اسید و 10 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین کم‌ترین تعداد کلونی مشاهده شد.



نمودار 1. تاثیر رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید را بر روی تعداد کلونی‌ها نشان می‌دهد. همان طور که در این نمودار مشاهده می‌شود کم‌ترین تعداد کلونی بعد از تیمار با رقت‌های 5، 10 و 15 میکرومولار رتینوئیک اسید دیده می‌شود و بیش‌ترین تعداد کلونی بعد از تیمار با رقت‌های 20 و 30 میکرومولار رتینوئیک اسید دیده می‌شود. * نشان‌گر اختلاف معنی داری بین گروه‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل می‌باشد ($p < 0/001$).

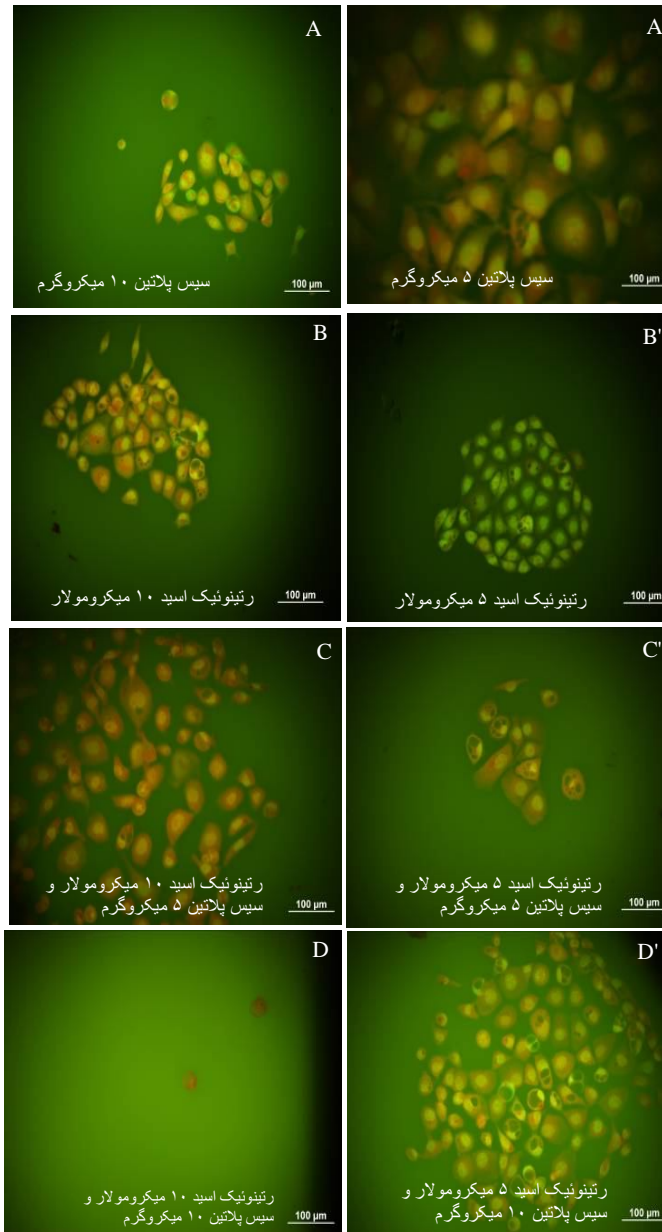


نمودار 2. تاثیر ترکیب رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید و سبب پلاتین بر روی تعداد کلونی‌ها. همان طور که مشاهده می‌شود مقایسه اختلاف میانگین گروه‌های سبب پلاتین 10 و 5 میکروگرم در میلی لیتر با بقیه گروه‌ها معنی دار است، کم‌ترین تعداد کلونی بعد از تیمار با ترکیب رتینوئیک اسید 10 میکرومولار با سبب پلاتین 10 میکروگرم در میلی لیتر دیده می‌شود. * نشان‌گر معنی دار بودن اختلاف تعداد کلونی‌ها در تیمار ترکیبی نسبت به گروه تیمار شده با غلظت مشابه سبب پلاتین به تنهایی می‌باشد ($p < 0/05$). ($p < 0/001$).

بررسی مرگ سلولی بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین و رتینوئیک اسید

سلول‌ها در پلیت 6 خانه به مدت 10 روز تحت تاثیر رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید و سیس پلاتین قرار گرفتند و بعد از رنگ آمیزی با آکریدین اورنج و اتدیوم بروماید درصد سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این رنگ آمیزی نشان داد غلظت 5 میکرومولار رتینوئیک اسید باعث مرگ سلولی از نوع آپوپتوتیک یا نکروتیک نمی‌شود. در گروه‌های ترکیب تیمار 5 و 10 میکرومولار رتینوئیک اسید با 10 و 5

میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین نسبت به گروه‌هایی که تنها با سیس پلاتین یا رتینوئیک اسید تیمار شده بودند مرگ سلولی بیشتری را نشان داد (شکل 5 و نمودار 2). گروه ترکیبی 5 و 10 میکرومولار رتینوئیک اسید با 5 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین مرگ سلولی از نوع آپوپتوتیک اولیه مشاهده شد ولی در ترکیب 10 میکرومولار رتینوئیک اسید با 10 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین مرگ سلولی از نوع آپوپتوتیک تاخیری و کلونی خیلی کمی مشاهده شد (شکل 5 و نمودار 2).



شکل 5. تاثیر رقت‌های مختلف رتینوئیک اسید و سیس پلاتین و ترکیب آنها را با رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتدیوم بروماید نشان می‌دهد. تصاویر A، B، C و D به ترتیب تاثیر سیس پلاتین 10 میکروگرم در میلی‌لیتر و رتینوئیک اسید 10 میکرومولار و ترکیب رتینوئیک اسید 10 میکرومولار با رقت‌های سیس پلاتین 10 و 5 میکروگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهند که بیش‌ترین تاثیر را ترکیب دوزهای رتینوئیک اسید 10 میکرومولار و سیس پلاتین 10 میکروگرم در میلی‌لیتر دارد که باعث مرگ تمام سلول‌ها شده است و در تصاویر A', B', C', D' به ترتیب تاثیر رقت‌های رتینوئیک اسید 5 میکرومولار و سیس پلاتین 5 میکروگرم در میلی‌لیتر و ترکیب رتینوئیک اسید 5 میکرومولار با رقت‌های 10 و 5 میکروگرم در میلی‌لیتر سیس پلاتین را نشان می‌دهد که بیش‌ترین تاثیر را ترکیب رتینوئیک اسید 5 میکرومولار با سیس پلاتین 10 میکرومولار دارد و در تصویر B' کلونی کوچکی دیده می‌شود اما مرگ سلولی از نوع آپوپتوتیک و نکروتیک دیده نمی‌شود. L مخفف live و N مخفف Necrosis و EA مخفف Early Apoptosis و LA مخفف Late Apoptosis می‌باشد (بزرگ‌نمایی $\times 200$).

بحث

در این مطالعه افزایش اثرات ضد سرطانی سیس پلاتین در ترکیب با رتینوئیک اسید تمام ترانس بر روی رده سلولی KYSE-30 با روش رنگ آمیزی اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید بررسی شد. یافته‌ها نشان داد که ترکیب تیمار رتینوئیک اسید تمام ترانس با سیس پلاتین باعث افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک می‌شود و بیش‌ترین اثر در ترکیب تیمار با رتینوئیک اسید 10 میکرومولار و سیس پلاتین 10 میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شد. مطالعات قبلی نشان داده که رتینوئیک اسید می‌تواند باعث القاء آپوپتوز شود. افزایش اثرات سیتوتوکسیک سیس پلاتین به وسیله رتینوئیک اسید تمام ترانس بر اساس مطالعات قبلی بر روی سرطان سلول‌های سر و گردن و تخمدان نشان داده شده است (7). استفان و همکارانش با مطالعه بر روی رده سلولی سرطان سنگ فرشی ســـر و گردن (UMSCC10b, UMSCC10b-Pt/15S) نشان دادند که رتینوئیک اسید تمام ترانس باعث افزایش اثرات سیتوتوکسیکی سیس پلاتین به وسیله القاء آپوپتوز می‌شود (2). مشابه این مطالعه در سال 1995 توسط سک و همکارانش بر روی سرطان سلول سنگ فرشی انجام شد، آنها نشان دادند که ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس و سیس پلاتین و 5 فلوئورواوراسیل باعث افزایش میزان مرگ سلولی می‌شود و رتینوئیک اسید می‌تواند باعث افزایش مداخلات داروها در ایجاد اختلال در سنتز DNA شود (12).

مرگ برنامه ریزی شده سلول یکی از مکانیسم‌های جلوگیری از ایجاد تغییرات نئوپلاستیک می‌باشد که با حذف سلول دارای DNA آسیب دیده باعث محافظت ارگانیزم از ایجاد سرطان می‌شود. بنابر این عواملی که بتوانند باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های پیش سرطانی و سرطانی شوند می‌توانند به عنوان دارو در سرطان‌ها استفاده شوند (3، 13).

در این مطالعه نتایج حاصل از ارزیابی کلونی با رنگ آمیزی کریستال ویوله نشان داد که رتینوئیک اسید

تمام ترانس در غلظت‌های پایین (5 و 10 میکرومولار) باعث کاهش تعداد و اندازه کلونی‌ها نسبت به گروه کنترل شده بود و در غلظت‌های بالا (15، 20 و 30 میکرومولار) باعث افزایش تعداد کلونی‌ها شد و مطالعات چن و همکارانش نشان داد که رتینوئیک اسید بیشتر باعث توقف سیکل سلولی در سلول‌های سرطان معده در مرحله G0/G1 می‌شود و با افزایش سطح پروتئین P21 باعث افزایش آپوپتوز می‌شود (14-17). هم‌چنین مطالعات میکروسکوپی نشان داد که غلظت‌های 15، 20 و 30 میکرومولار رتینوئیک اسید باعث القای تمایز سلول‌های سرطان مری می‌شود. رتینوئیک اسید یکی از عوامل شناخته شده القای کننده تمایز سلولی می‌باشد که به شکل گسترده در لوسمی پرومیلوسیت برای القای تمایز استفاده می‌شود. هم‌چنین رتینوئیک اسید برای القای تمایز سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود (18).

این مطالعه هم‌چنین حالت اشباعی را در رقت‌های بالای 15 میکرومولار رتینوئیک اسید نشان داد. در رقت‌های بالاتر از 15 میکرومولار رتینوئیک اسید، نه تنها اثری را در کاهش تعداد کلونی نشان نداد بلکه باعث تکثیر بیشتر سلول‌های سرطانی شد. مطالعات قبلی نیز نشان داده که غلظت بالای رتینوئیک اسید دومین (Domine) اتصال به رتینوئیک اسید را به طرف دومین اتصال به لیگاند پروتئین الحاقی RAR α -PML هدایت می‌کند. این امر منجر به یک تغییر ساختاری می‌شود که کمپلکس کمک مهار کننده هیستون داستیلاز (Histon Dactylase) را با یک کمپلکس کمک فعال کننده تعویض می‌کند. در نتیجه زن‌های هدف RAR α بیان شده و باعث مهار تمایز می‌شود و در نتیجه به جای اثر مهار، باعث تکثیر می‌شود (19).

هانگ و همکارانش با مطالعه اثر رتینوئیک اسید بر روی رده سلولی سرطان حلق و بینی (BxPc-3, T3M-) 4 نشان دادند که غلظت‌های بالاتر از 10 میکرومولار رتینوئیک اسید تاثیری در مهار رشد سلولی نداشت و اعلام کردند که اثرات مهار رشد سلولی رتینوئیک اسید با افزایش

1. Gutierrez-Mazariegos J, Theodosiou M, Campo-Paysaa F, Schubert M, editors. Vitamin A: A multifunctional tool for development. *Seminars in cell & developmental biology*; 2011;22(6):603-10.
2. Hung S-H, Lee F-P, Su C-H, 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. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2013;270(2):695-704.
3. Breitman T, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(5):2936-40.
4. Reedijk J, Lohman P. Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action. *Pharmaceutisch Weekblad*. 1985;7(5):173-80.
5. Harrison LB, Sessions RB, Hong WK. *Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach*; [includes Fully Searchable Online Text & Images]; Wolters Kluwer Health; 2009.
6. Shen J, Huang C, Jiang L, Gao F, Wang Z, Zhang Y, et al. Enhancement of cisplatin induced apoptosis by suberoylanilide hydroxamic acid in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Biochemical pharmacology*. 2007;73(12):1901-9.
7. Aebi S, Kröning R, Cenni B, Sharma A, Fink D, Los G, et al. all-trans retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells. *Clinical cancer research*. 1997;3(11):2033-8.
8. Shalinsky DR, Bischoff ED, Gregory ML, Lamph WW, Heyman RA, Hayes JS, et al. Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with ALRT1057 (9-cis retinoic acid) in human oral squamous carcinoma xenografts in nude mice. *Clinical cancer research*. 1996;2(3):511-20.

غلظت آن ثابت مانده و مکانیسم اساسی، اثر مهاری سریعا به اوج خود رسیده و اشباع می گردد(2).

یکی دیگر از نتایج این مطالعه مهارتشکیل کلونی بعد از ترکیب با رتینوئیک اسید و سیس پلاتین است. در مطالعه مشابهی، تیمر بوشکا و همکارانش بر روی رده سلولی سرطان جنین انسان (Tera-2, Tera2-CP) نشان دادند که رتینوئیک اسید تمام ترانس می تواند باعث القای تمایز در رده سلولی جنین انسان شده و باعث افزایش حساسیت آنها به داروی سیس پلاتین شود(20). احتمالا رتینوئیک اثر مشابهی بر دیگر داروهای شیمی درمانی رایج داشته باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده نشان داد که رتینوئیک اسید باعث تسهیل آپوپتوزیس القاء شده با سیس پلاتین و افزایش اثرات ضد سرطانی سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطان مری (KYSE-30) می شود. بنابر این در تیمار ترکیبی با سیس پلاتین و رتینوئیک اسید نیاز به غلظت پائین تری از سیس پلاتین برای ایجاد اثری مشابه با غلظت بالای این ماده می باشد. این نتیجه می تواند در درمان سرطان مری از نظر کاهش اثرات جانبی سیس پلاتین مفید باشد. پیشنهاد می شود مطالعات آتی بر روی حیوانات آزمایشگاهی در این زمینه انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله با عنوان بررسی اثرات سیتوتوکسیک ترکیب رتینوئیک اسید تمام ترانس با سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطان مری KYSE-30 بر گرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره 05 می باشد. نویسندگان بر خود لازم می دانند که از آقای دکتر شهاب بهلولی دکترای تخصصی دارو سازی به خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه قدردانی نمایند.

منابع

15. Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell*. 2007;129(4):723-33.
16. 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. *Clinical cancer research*. 2004;10(3):1130-40.
17. Soprano KJ, Soprano DR. Retinoic acid receptors and cancer. *The Journal of nutrition*. 2002;132(12):3809S-13S.
18. Sanz MA, Martín G, Díaz-Mediavilla J. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;338(6):393-4.
19. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature reviews cancer*. 2003;3(2):89-101.
20. Timmer-Bosscha H, de Vries EG, Meijer C, Oosterhuis JW, Mulder NH. Differential effects of all-trans-retinoic acid, docosahexaenoic acid, and hexadecylphosphocholine on cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in a cisplatin-sensitive and resistant human embryonal carcinoma cell line. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1998;41(6):469-76.
9. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT, Murray L. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*. 2008;168(3):237-49.
10. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90.
11. Zhao J-S, Li W-J, Ge D, Zhang P-J, Li J-J, Lu C-L, et al. Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PloS one*. 2011;6(6):e21419-20.
12. 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. *International journal of cancer*. 1995;61(3):409-15.
13. Oridate N, Lotan D, Xu X-C, Hong WK, Lotan R. Differential induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clinical cancer research*. 1996;2(5):855-63.
14. Chen Z, Wu Q, Chen Y, Su W. Regulation of cell cycle by retinoic acid in gastric cancer cells]. *Shi yan sheng wu xue bao*. 1999;32(2):135-40.