

# ترکیب داروهای اگزالی پلاتین و دیکلوفناک بر بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ در رده سلولی سرطانی کولورکتال (SW480)

مونا هاشم زاده<sup>۱</sup>، طاهره ناجی<sup>۱</sup>، رحیم احمدی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، <sup>۲</sup>گروه فیزیولوژی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷

## چکیده

**زمینه و هدف:** القای آپوپتوز یکی از اهداف اساسی در تولید داروهای ضدسرطان است. ارزیابی ارتباط بین داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی (NSAID) و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی امیدوار کننده است. لذا هدف از این مطالعه تعیین ترکیب داروهای اگزالی پلاتین و دیکلوفناک بر بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ در رده سلولی سرطانی کولورکتال (SW480) با استفاده از دستگاه Real Time PCR بود.

**روش بررسی:** در این تحقیق تجربی که در سال ۱۳۹۹ انجام شد، سلول‌های سرطانی کولورکتال رده SW480 با غلظت‌های مختلف از اگزالی پلاتین و دیکلوفناک و همچنین ترکیبی توأم از دیکلوفناک و اگزالی پلاتین تیمار شدند. جهت بررسی زنده ماندن سلول‌ها از روش MTT استفاده شد و غلظت مهار میانه (IC<sub>50</sub>) برای هر گروه به دست آمد و جهت ارزیابی بیان ژن‌های Caspase8 و caspase9 از روش ریل تایم پی‌سی‌آر استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری روش واریانس یک طرفه و آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** در تیمار اگزالی پلاتین بر سلول‌های SW480، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی این رده سلولی نسبت به کنترل شدند ( $p < 0.001$ ) و غلظت مهار میانه ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. در تیمار سلول‌ها با دیکلوفناک نیز غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور بسیار معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی این رده سلولی نسبت به کنترل شدند ( $p < 0.001$ ). غلظت‌های ۵، ۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اگزالی پلاتین در ترکیب با ۲۵۰ میکروگرم از دیکلوفناک به طور بسیار معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی این رده سلولی نسبت به کنترل شدند ( $p < 0.001$ ) و غلظت مهار میانه اگزالی پلاتین همراه شده با دیکلوفناک، معادل با ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. همچنین تیمار توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین منجر به افزایش بسیار معنی‌دار بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ شد ( $p < 0.001$ ). به طوری که بیان ژن کاسپاز ۸ حدود ۳/۷ و کاسپاز ۹ حدود ۱/۸ برابر نسبت به کنترل در این آزمایش افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** دیکلوفناک به همراه اگزالی پلاتین می‌تواند موجب اثرات سائیتوتوکسیک بیشتری در مقایسه با استفاده از اگزالی پلاتین به تنهایی در سلول‌های سرطانی SW480 شود. ترکیب توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین با افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ همراه بوده و بر این اساس بررسی احتمالی کاربرد داروی دیکلوفناک به همراه اگزالی پلاتین در درمان سرطان کولون حایز اهمیت است.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز، اگزالی پلاتین، دیکلوفناک، سرطان کولورکتال، کاسپاز

\*نویسنده مسئول: طاهره ناجی، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه علوم پایه  
Email: tnajj2002@gmail.com

## مقدمه

درمانی خودشان را با القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده اعمال می‌کنند. القای مرگ برنامه‌ریزی شده یکی از مهم‌ترین روش‌ها در از بین بردن سلول‌های سرطانی است (۵). از طرفی به منظور بررسی مرگ سلولی آپوپتوزی از روش‌های مختلفی چون؛ بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های تحت درمان، فلوسایتومتری، فعال شدن کاسپازها و ژن‌های دخیل در القای آپوپتوز و میزان بیان آنها استفاده می‌شود. وقایع آپوپتوز به وسیله خانواده‌ای از سیستمین پروتئازها، تحت عنوان کاسپازها اتفاق می‌افتد. کاسپازها به عنوان مهم‌ترین عضو آپوپتوز و هماهنگ کننده مسیر مرگ، باعث تخریب پروتئین‌ها یا فعالسازی کاسپازهای دیگر می‌شوند (۶).

دیکلوفناک داروی ضدالتهاب غیر استروئیدی است که به عنوان ضد درد و ضد التهاب استفاده می‌شود. مکانسیم اثر اصلی داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی از جمله دیکلوفناک مهار تولید پروستاگلاندین‌ها است. این داروها اثر ضدالتهابی خود در بدن را با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۱ و ۲ و پروستاگلاندین سنتتاز اعمال می‌کنند و سنتز پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان A2 را که عامل التهابی می‌باشند، مهار می‌کند. از طرفی دیکلوفناک باعث آسیب میتوکندریایی و آزاد شدن سیتوکروم C از فضای بین غشایی میتوکندری به سیتوزول می‌شود، که به نوبه خود سبب فعال شدن کاسپاز و متعاقب آن فاز اجرایی آپوپتوز می‌شود.

سرطان روده بزرگ (کولورکتال) سومین سرطان شایع دنیا و دومین علت مرگ ناشی از سرطان است. علت دقیق بروز سرطان کولورکتال ناشناخته است، ولی پژوهش‌ها نشان داده است عوامل خطر خاصی شانس ابتلاء افراد را به سرطان کولورکتال افزایش می‌دهند (۱). خاصیت ضدسرطانی داروهای ضدسرطانی سال‌هاست که شناخته شده است و به همین دلیل استفاده از داروهای مناسب جهت درمان سرطان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۲).

با توجه به این که تغییرات ژنتیکی زیادی مورد نیاز است تا فرم سرطانی یک سلول ایجاد شود و به علت این که ایجاد بسیاری از سرطان‌ها جنبه ارثی دارد، استفاده از موادی که بتوانند فرآیند متاستازی را مهار کنند مورد توجه می‌باشد، یعنی اگر چه نمی‌توان از ایجاد تومور اولیه جلوگیری کرد، ولی می‌توان جلوی فرآیند متاستازی که علت اصلی مرگ و میر بسیاری از بیماران سرطانی است را گرفت (۳).

آپوپتوز نوعی خودکشی سلولی است که از خصوصیات ذاتی سلول محسوب می‌شود. این رویداد مستلزم بیان یک برنامه ژنتیکی می‌باشد و هرگونه اختلال در این فرآیند موجب بیماری می‌شود (۴). سلول‌های سرطانی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز می‌گریزند که یکی از دلایل آن تغییر در بیان ژن‌هایی است که در تنظیم این فرآیند دخالت دارند. بیشتر عوامل ضدسرطانی آثار

مراکز پژوهش‌های سرطان در جستجوی عوامل ضدسرطان با ضریب اطمینان بیشتری برای بیماران می‌باشند(۸). علاوه بر این می‌توان در ترکیب با عوامل شیمی درمانی سایتوتوکسیک برای فعالیت ضد سرطانی بیشتر، از عوامل سینرژیسیم و یا ترکیب داروهای مختلف استفاده کرد و به دنبال راهی برای کاهش عوارض داروها و تأثیرگذاری بیشتر بود(۹).

از آنجایی که امروزه سرطان کلورکتال یکی از سرطان‌های شایع در جهان است و در پژوهش‌های قبلی هر کدام از داروها به تنهایی مورد بررسی قرار گرفتند و با توجه به این که مکانیسم دو داروی دیکلوفناک و اگزالی پلاتین در القای آپوپتوز می‌باشند، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی ترکیب داروهای اگزالی پلاتین و دیکلوفناک بر بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ در رده سلولی سرطانی کلورکتال (SW480) با استفاده از دستگاه Real Time PCR بود.

### روش بررسی

در این تحقیق تجربی که در سال ۱۳۹۹ در دانشکده داروسازی، واحد علوم پزشکی دانشگاه آزاد تهران انجام شد، رده سلولی سرطانی کلورکتال LS174T از بانک سلول انستیتو پاستور ایران به صورت ویال فریز شده خریداری شد و در شرایط استاندارد مطابق با پروتکل، کشت و تکثیر داده شدند. پس از کشت سلولی و آماده‌سازی آن‌ها، تست ام‌تی‌تی بر روی آن‌ها انجام گرفت. با در نظر

اگزالی پلاتین داروی نسل سوم پلاتینوم است که با از بین بردن سلول‌های سرطانی و کند کردن رشد تومور عمل می‌کند. اگزالی پلاتین برای درمان سرطان‌های پیشرفته روده بزرگ یا راست روده به کار می‌رود. اگزالی پلاتین یک داروی شیمی درمانی مورد تأیید FDA در درمان سرطان کولون متاستاتیک است که از طریق تشکیل کمپلکس‌های پلاتین که با مولکول‌های DNA کراس لینک برقرار می‌کنند، از تکثیر و نسخه برداری سلولی جلوگیری می‌کنند. این دارو در سمیت سلولی و القای فرایند آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کلورکتال نقش دارد. یکی از مکانیسم‌هایی که داروی اگزالی پلاتین رشد سلول‌های سرطانی روده بزرگ را مهار می‌کند، آپوپتوزیس است. آپوپتوزیس مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستازی بافتی ضروری است. آپوپتوزیس در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های T خود واکنش‌گر نقش دارد. هرگونه اختلال در روند آپوپتوزیس، منجر به بیماری می‌شود که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی باشد که خود منجر به ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی می‌شود(۷).

از جمله درمان‌های معمول سرطان شیمی درمانی است. طبق پژوهش‌های صورت گرفته شیمی درمانی توأم با عوارض زیادی از جمله؛ تهوع، استفراغ، خستگی، آنمی و آلپوسی است و می‌تواند بر کیفیت زندگی بیمار تأثیر منفی زیادی بگذارد. امروزه

می‌باشد. اصول کار سه روزه است. در روز اول یک فلاسک پر از سلول انتخاب کرده و جداسازی و پاساژ سلول را انجام داده، در چاهک‌ها به مقدار مساوی سلول ریخته شده است. برای این کار ابتدا با استفاده از لام نئوبار سلول‌ها را شمارش کرده سپس در هر چاهک ۱۰۰ لاند سلول ریخته که این تعداد معادل ۱۰۰۰۰ سلول می‌باشد. سپس پلیت را درون انکوباتور CO<sub>2</sub> دار به مدت ۲۴ ساعت گذاشته تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند و ۵۰ درصد حجم چاهک‌ها را پرکنند. در روز دوم ابتدا محیط رویی را از هر چاهک به وسیله سرنگ استریل خارج کرده و سپس ۱۰۰ لاند از دو دارو روی هر چاهک ریخته شد و برای هر رقت هشت چاهک در نظر گرفته شد. سپس دوباره داخل انکوباتور قرار داده برای کار آزمایشگاهی این تحقیق پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد.

رنگ MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است. اگر این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد حل شود ترکیب زرد رنگی را ایجاد می‌کند. اساس این تست شکستن نمک MTT به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده می‌باشد. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورامازان قهوه‌ای رنگ است که به وسیله دی‌متیل سولفاکساید (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه تعداد سلول‌های فعال و زنده بیش‌تر باشد میزان رنگ قهوه‌ای ایجاد شده بیش‌تر خواهد بود. سپس میزان جذب نوری رنگ قهوه‌ای ظاهر شده در سوپ

گرفتن محیط کشت کافی برای رشد سلول‌ها، دارو‌ها به پلیت اضافه شد. سپس پلیت‌ها درون انکوباتور به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت نگه‌داری شدند. پس از گذراندن دوران معین درون انکوباتور سوپ رویی از پلیت تخلیه شده و رنگ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-(2,5-DiphenyltetrazoliumBromide) به آن اضافه شد. در این روش از پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف استفاده شد. به این صورت که سلول‌های آماده شده درون میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و تحت تیمار دوزهای مختلف اگزالی پلاتین (شرکت سبحان دارو، شماره سریال ۴۳۱۰۵) و دیکلوفناک (شرکت البرز دارو، شماره سریال ۲۱۵۰۳) و ترکیب توأم آن‌ها با هم قرار گرفت. غلظت‌های مختلف از طریق رقت‌سازی سریالی از داروهای دیکلوفناک (۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵، ۶۲/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) و اگزالی پلاتین (۶۲/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) هر کدام به تنهایی در میکروتیوپ‌های استریل تهیه شده و بر روی سلول‌ها تیمار شد. سپس دوز غلظت مهار میانه برای هر یک به دست آمد و با توجه به نتایج به دست آمده، ترکیب این دو دارو (به غلظت‌های ۲۵۰ میکروگرم از دیکلوفناک و غلظت‌های مختلف اگزالی پلاتین) بر روی سلول‌های تیمار شده و مجدداً تست ام تی تی انجام شد. گروه کنترل منفی نیز به طور مجزا در نظر گرفته شد و غلظت مهار میانه برای ترکیب توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین نیز به دست آمد. اساس تست MTT بررسی اثر سمیت یک ماده بر روی سلول

5'-GAG GTG AAG-3' پرایمر مستقیم ژن کاسپاز ۹،  
3'-GGG AAC TGC AGG TGG CTG-3' پرایمر معکوس ژن  
کاسپاز ۹، 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'  
پرایمر مستقیم ژن خانه دار GAPDH، 5'-  
3'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' پرایمر معکوس  
ژن خانه دار GAPDH.

سپس در شرایط دمایی ۹۵ درجه ۱۰ دقیقه،  
در ۴۰ سیکل با چرخه‌های ۹۵ درجه ۱۵ ثانیه و ۶۰  
درجه ۱ دقیقه تکثیر گردید. متداول‌ترین رنگ مورد  
استفاده در این تکنیک سایبرگرین می‌باشد.  
سایبرگرین یک رنگ اینترکاله و فلورسنت است که به  
شیارهای کوچک رشته‌های cDNA متصل شده و با  
جذب طول موج ۴۹۸، نور ۵۲۲ نانومتر ساطع می‌کند  
که به وسیله دستگاه الیزا ثبت می‌شود. سایبرگرین به  
الگوهای تکرار رشته‌ای متصل نمی‌شود، لذا در  
تکرار رشته‌ای‌ها نور ساطع نمی‌گردد و فقط زمانی که  
الگوهای دو رشته‌ای داشته باشیم متصل شده و نور  
ساطع گردد در طی چرخه‌های PCR محصول دو  
رشته‌ای تولید می‌شود و بنابراین رنگ سایبرگرین به  
آن‌ها متصل می‌شود. هرچه شدت تابش فلوروسنت  
بیش‌تر باشد نشان‌دهنده این موضوع است که  
میزان DNA دو رشته‌ای بیش‌تر است، بنابراین افزایش  
شدت تابش فلوروسنت با غلظت  
ds DNA (Double strain DNA) متناسب است،  
سایبرگرین یک رنگ غیراختصاصی است، لذا برای  
تمامی آزمایش‌ها قابل استفاده می‌باشد. تمامی  
آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شده است.

رویی پلیت‌ها در طول موج ۵۷۰ تا ۶۵۰ نانومتر با  
استفاده از دستگاه ELISA (BioTec ELx 800)  
اندازه‌گیری شد. آن‌گاه بر اساس جذب نوری نمونه‌ها،  
درصد زنده‌مانی سلول‌ها در هر گروه محاسبه شد.

در روش Real time-PCR (دستگاه Applied Biosystem)  
واکنش به صورت دو مرحله‌ای انجام شد. در واکنش  
دو مرحله‌ای نسخه‌برداری معکوس و تکثیر در  
تیوب‌های جداگانه صورت گرفت. جهت ارزیابی بیان  
ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ پس از مشخص شدن غلظت  
IC50 داروهای دیکلوفناک و اگزالی پلاتین سلول‌ها به  
مدت ۲۴ ساعت با ۲۵۰ میکروگرم دیکلوفناک و ۲۵  
میکروگرم اگزالی پلاتین بر روی رده سلولی  
کولورکتال اثر داده شد و سپس با استفاده از کیت  
استخراج RNA (شرکت Rosch)، RNA استحصال گردید.  
الگوی مورد نظر در واکنش Real time PCR مولکول  
cDNA می‌باشد. کیت مورد استفاده در سنتز cDNA  
کیت تاکارا بود. برای ساخت cDNA از RNA استخراج  
شده، cDNA به همراه پرایمر اختصاصی طراحی شده  
در دستگاه قرار گرفت، توالی ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ به  
عنوان ژن هدف و توالی ژن GAPDH به عنوان ژن  
رفرنس از سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> اخذ  
گردید. پرایمرهای مستقیم و معکوس برای هر ژن از  
مقالات مربوطه استخراج شد و برای انتخاب بهترین  
پرایمر با BLAST ارزیابی گردید. پرایمرها شامل:  
5'-GAT CAA GCC CCA CGA TGA C-3' پرایمر مستقیم  
ژن کاسپاز ۸، 3'-CCT GTC CAT CAG TGC CAT AG-3'  
پرایمر معکوس ژن کاسپاز ۸، 5'-CAT TTC ATG GTG

پس از پایان روند تکثیر به وسیله نرم‌افزار، داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته و در نهایت نتایج گروه کنترل و تیمار از لحاظ بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از نحوه بیان ژن‌ها و آنالیز آنها به روش نیمه کمی با فرمول  $\Delta\Delta CT$  و با دستگاه Real Time PCR انجام شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری روش واریانس یک طرفه و آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

در این مطالعه سلولی، به بررسی اثرات داروی دیکلوفناک و اگزالی پلاتین به تنهایی و به صورت توأم به روش MTT پرداخته شد. نتایج حاصل از مطالعه اثر سایتوتوکسیک اگزالی پلاتین بر رده سلولی SW480 نشان داد که با افزایش غلظت اگزالی پلاتین، زنده‌مانی رده سلولی SW480 کاهش یافت. به طوری که غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور بسیار معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی این رده سلولی نسبت به کنترل شدند ( $p < 0.001$ )، این اثر به صورت وابسته به غلظت بوده است. در غلظت‌های ۶/۲۵ و ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی اگزالی پلاتین نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معنی‌داری نشد ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۱). همچنین نتایج نشان داد IC50 اگزالی پلاتین معادل با ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. به عبارتی، میزان

کشندگی سلولی ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اگزالی پلاتین معادل با ۵۰ درصد می‌باشد (نمودار ۲).

نتایج حاصل از مطالعه اثر سایتوتوکسیک دیکلوفناک بر رده سلولی SW480 نشان داد که با افزایش غلظت دیکلوفناک، زنده‌مانی رده سلولی SW480 کاهش یافت، به طوری که غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طور بسیار معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی این رده سلولی نسبت به گروه کنترل شدند ( $p < 0.001$ ). درصد زنده‌مانی سلول‌ها در زمان تیمار شدن با غلظت ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی دیکلوفناک نزدیک به ۸۴ درصد و غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نزدیک به ۹۵ درصد بوده که در این غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل دچار تغییر معنی‌داری نشدند ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۳). همچنین IC50 دیکلوفناک معادل با ۵۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (نمودار ۴).

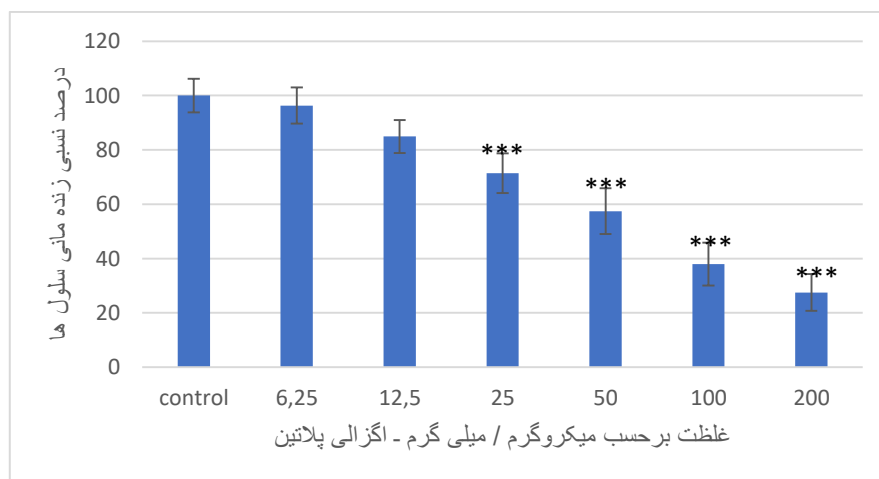
نتایج حاصل از مطالعه اثر سایتوتوکسیک توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین بر رده سلولی SW480 نشان داد که با افزایش غلظت اگزالی پلاتین به همراه دیکلوفناک، زنده‌مانی رده سلولی SW480 کاهش یافت، به طوری که غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اگزالی پلاتین در ترکیب با ۲۵۰ میکروگرم از دیکلوفناک به طور بسیار معنی‌داری باعث کاهش زنده‌مانی این رده سلولی نسبت به کنترل شدند ( $p < 0.001$ ). آنالیز آماری نشان داد در غلظت ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اگزالی

بر میلی‌لیتر از اگزالی پلاتین و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دیکلوفناک میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ با تست ریل تایم پی‌سی‌آر تعیین شد که منجر به افزایش بسیار معنی‌دار بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ گردید ( $p < 0.001$ )، به طوری که بیان ژن کاسپاز ۸ حدود ۳/۷ برابر نسبت به کنترل و کاسپاز ۹ حدود ۱/۸ برابر نسبت به کنترل در این آزمایش افزایش یافت (نمودار ۷).

نمودارهای ۸ و ۹ منحنی ذوب (Melt Curve) مربوط به ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ می‌باشد. نمودار با یک قله نشان می‌دهد که بیان ژن به صورت اختصاصی بوده است.

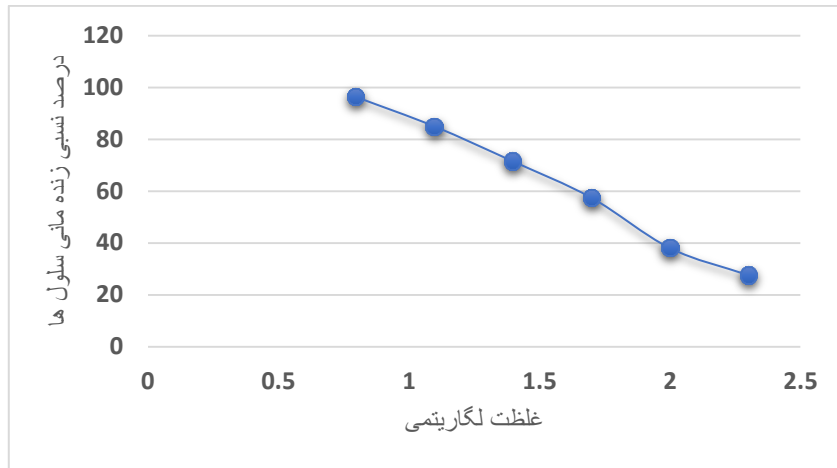
پلاتین در ترکیب با ۲۵۰ میکروگرم دیکلوفناک سبب مهار رشد سلول‌ها به میزان ۲۰ درصد در مقایسه با گروه کنترل شده که این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار است ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۵). همچنین نتایج نشان داد IC50 اگزالی پلاتین که به همراه دیکلوفناک به کاررفته، معادل با ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. به عبارتی، میزان کشندگی سلولی در ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اگزالی پلاتین در ترکیب ۱ توأم با ۲۵۰ میکروگرم دیکلوفناک معادل با ۵۰ درصد می‌باشد (نمودار ۶).

جهت ارزیابی اثرات توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین بر بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ در سلول‌های SW480 پس از تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۵ میکروگرم

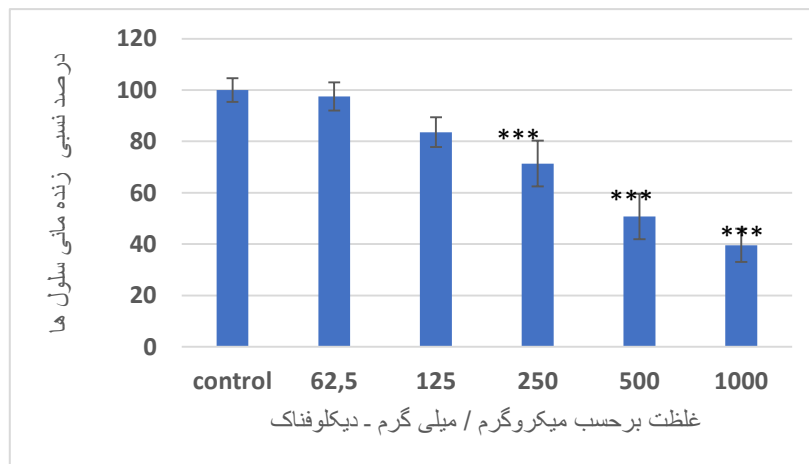


نمودار ۱: درصد زنده مانی نسبی سلول در تیمار اگزالی پلاتین در رده سلولی sw480

\*\*\*نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین گروه تحت تیمار با گروه کنترل می‌باشد ( $p < 0.001$ )

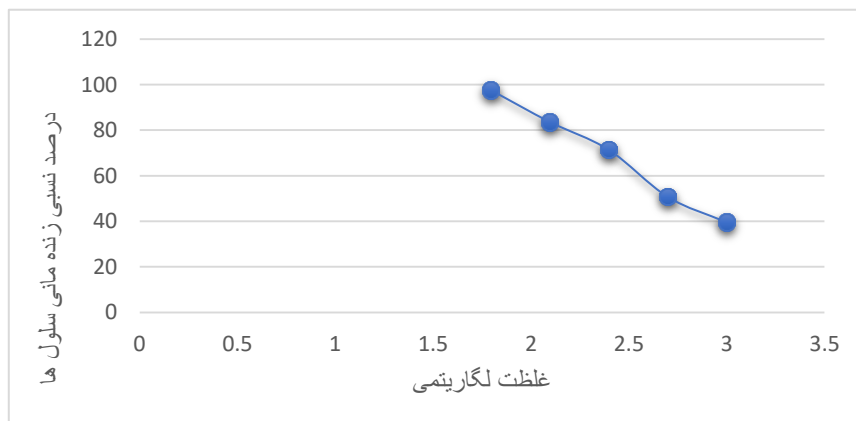


نمودار ۲: IC50 در تیمار اگزالی پلاتین بر رده سلولی SW480



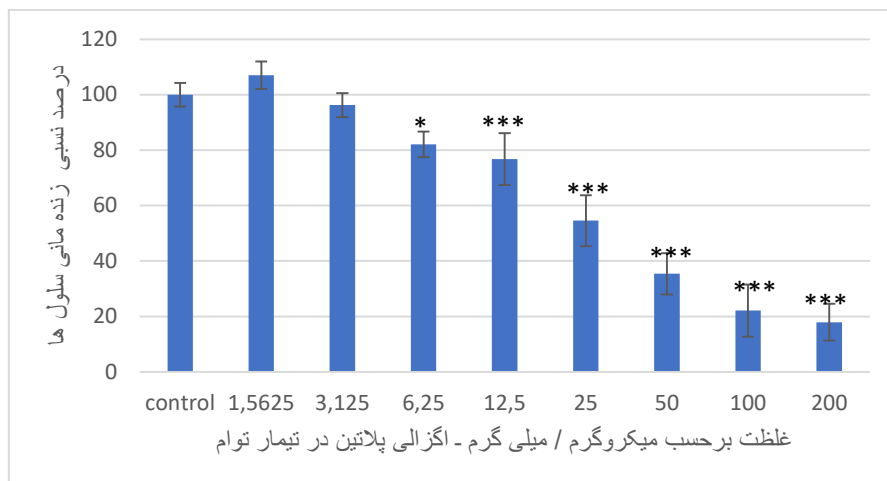
نمودار ۳: درصد زنده مانده نسبی سلول در تیمار دیکلوفناک بر رده سلولی SW480

\*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی داری بین گروه تحت تیمار با گروه کنترل می باشد ( $p < 0.001$ )



نمودار ۴: IC50 برای تیمار دیکلوفناک بر رده سلولی SW480

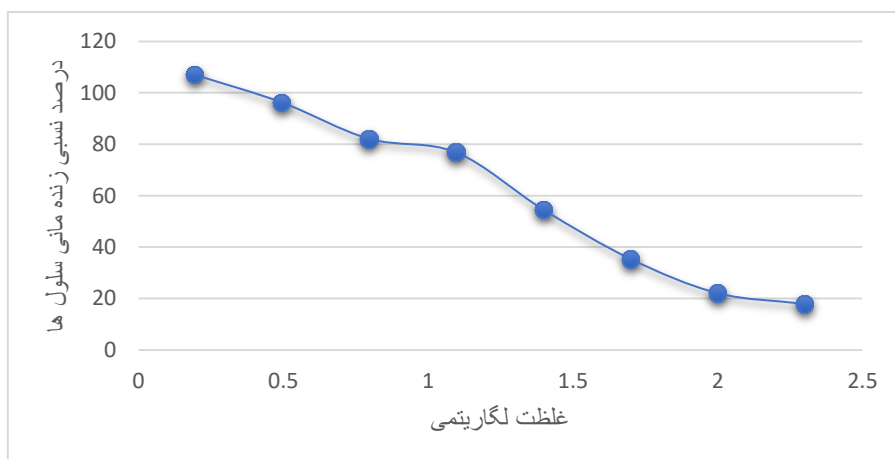




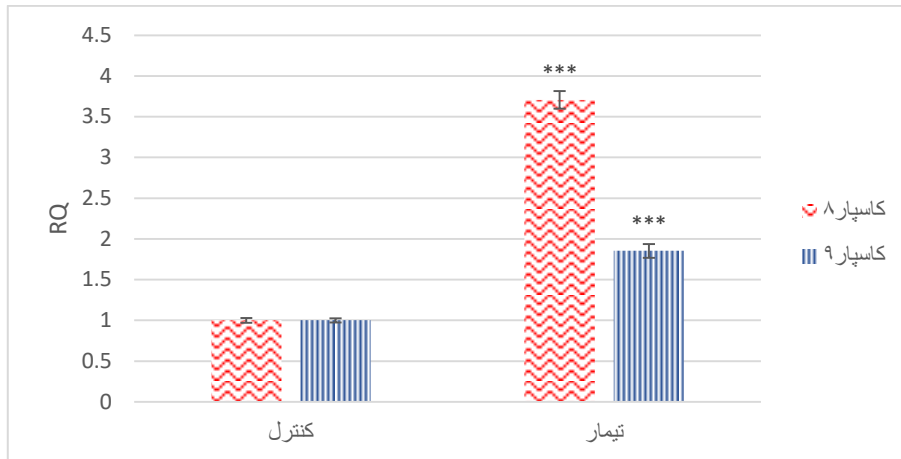
نمودار ۵: درصد زنده مانی نسبی سلول در تیمار توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین بر رده SW480

\*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی داری بین گروه تحت تیمار با گروه کنترل می باشد ( $p < 0.001$ )

\* نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه تحت تیمار با گروه کنترل می باشد ( $p < 0.05$ )



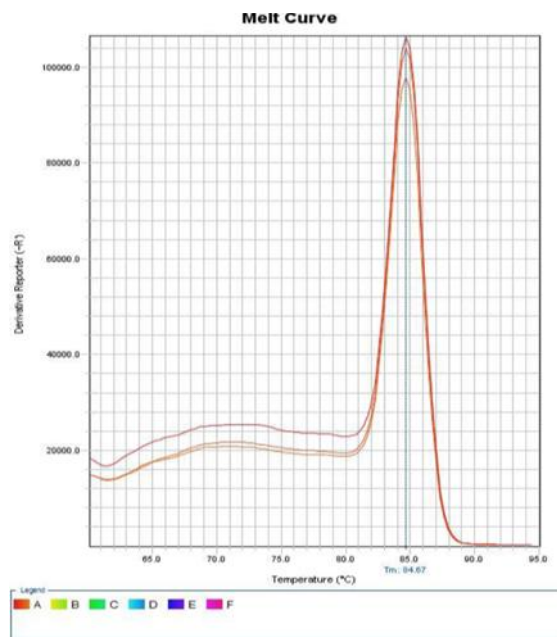
نمودار ۶: IC50 در تیمار توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین بر رده سلولی SW480



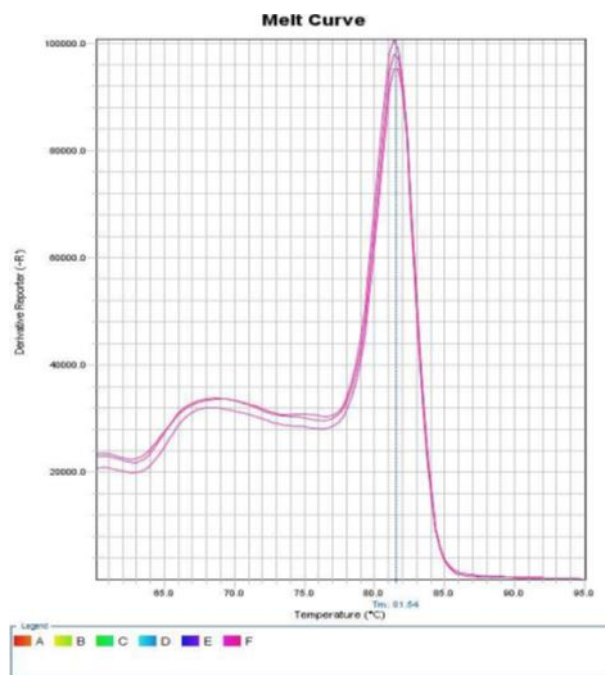
نمودار ۷: بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ در تیمار توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین در مقابل کنترل

\*\*\*نشان دهنده اختلاف معنی داری بین گروه تحت تیمار با گروه کنترل می باشد ( $p < 0.001$ )

نمودار ۸ و ۹ در متن جایگامش مشخص نیست



نمودار ۸: منحنی ذوب کاسپاز ۸



نمودار ۹: منحنی ذوب کاسپاز ۹

**بحث**

سرطان روده بزرگ (کولورکتال) سومین سرطان شایع دنیا و همچنین ایران است و در مردان شیوع بیشتری دارد. در سرطان کولورکتال سلول‌های رکتوم و کولون غیر طبیعی بوده و بدون کنترل و نامنظم تقسیم می‌شوند. علت دقیق بروز سرطان کولورکتال ناشناخته است، ولی پژوهش‌ها نشان داده است عوامل خطر خاصی شانس ابتلاء افراد را به سرطان کولورکتال افزایش می‌دهد(۱)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی ترکیب داروهای اگزالی پلاتین و دیکلوفناک بر بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ در رده سلولی سرطانی کولورکتال(SW480) با استفاده از دستگاه Real Time PCR بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که در سلول‌های سرطانی کولورکتال تیمار شده با ترکیبی از اگزالی پلاتین و دیکلوفناک اثر سایتوتوکسیک بیشتری نسبت

به استفاده از اگزالی پلاتین به تنهایی مشاهده شد. همچنین ترکیب توأم دو دارو منجر به افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ و ۹ شد. دیکلوفناک یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌باشد که مکانیسم عمل آن مهار سیکلواکسیژنازهاست.

سیکلوآکسیژنازها آنزیم‌های کلیدی در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین‌ها هستند و دارای دو ایزوآنزیم COX1, COX2 می‌باشند. آنزیم ۱ Cox در اکثر بافت‌ها به طور پیوسته بیان می‌شود و در عملکردهای فیزیولوژیک دخیل است، در حالی که آنزیم Cox2 به عنوان جزئی از واکنش‌های التهابی در پاسخ به تحریکات خارج سلولی القاء شده و در اعمال پاتولوژیکی دخالت دارد. در حقیقت، Cox 2 با التهاب، درد، رگزایی، سرطان و آلزایمر ارتباط دارد(۱۰).

چون - گومز و همکاران مطالعه‌ای تحت عنوان؛ دیکلوفناک باعث ایجاد آپوپتوز در هیپاتوسیت‌ها با

تغییر عملکرد میتوکندری و تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد را انجام دادند. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که فعال شدن هم‌زمان کاسپازهای ۸ و ۹ حداکثر پس از ۱۲ ساعت قرار گرفتن در معرض دیکلوفناک اتفاق می‌افتد. نتایج نشان داد که دیکلوفناک می‌تواند منافذ میتوکندری را باز کند. از سوی دیگر، آنتی‌اکسیدان‌ها قادر به جلوگیری از فعال شدن کاسپاز به وسیله دیکلوفناک بودند و نیز نشان داد که استرس اکسیداتیو در سطح میتوکندری در مبدا القاء MPT و فعال شدن آبشار کاسپازی صورت می‌گیرد. فعال شدن کاسپازی به وسیله برش بید انجام نمی‌شود و این نشان می‌دهد که مسیر گیرنده سلولی درگیر نیست. با این حال، آزادسازی وابسته به دوز کاسپاز ۸ از میتوکندری مشاهده شد، که نشان می‌دهد کاسپاز ۸ می‌تواند مستقل از گیرنده‌های مرگ سلولی پردازش شود. کاسپاز ۸ و ۹ به احتمال زیاد کاسپازهای اساسی در آپوپتوز ناشی از دیکلوفناک هستند. علاوه بر این، افزایش دوزهای اولیه بروز BCLXL موازی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری‌ها یافت شد. در نتیجه، مسیر میتوکندری احتمالاً تنها مسیر مرتبط با آپوپتوز ناشی از دیکلوفناک است (۱۱). اینسوی و همکاران مکانیسم مولکولی آپوپتوز ناشی از دیکلوفناک را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که ۲- متوکسی استرادیول، یک مهار کننده سوپراکسید دیسموتاز، به طور قابل توجهی افزایش آپوپتوز ناشی از دیکلوفناک را سبب شده است؛ یعنی دیکلوفناک همراه با ۲- متوکسی

استرادیول ممکن است در درمان لوسمی انسان اثر بالقوه درمانی داشته باشد. در واقع فرآیند آپوپتوز ناشی از دیکلوفناک بر سلول‌های HL ۶۰ با تولید گونه‌های فعال اکسیژن اتفاق می‌افتد که فعالیت Akt را سرکوب کرده و با فعال‌سازی کاسپاز ۸ و القاء آزادی سیتوکروم C موجب فعال‌سازی کاسپاز ۹ گردید (۱۲). بنابراین در مطالعه حاضر احتمالاً دیکلوفناک با مهار آنزیم COX2، پروستاگلاندین و فاکتورهایی که می‌تواند باعث رشد و ترویج تومورهای سرطانی شوند را مهار کرده و سبب آپوپتوز سلول‌های سرطانی کولورکتال گردیده است. به طور کلی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در حوزه پزشکی به شمار می‌رود (۱۴ و ۱۳). مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک اندامک میتوکندری در سلول باشد که با آزادسازی سیتوکروم C از آن آغاز می‌شود. هم راستا با نتایج این تحقیق، القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در پژوهش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، در مطالعه‌ای دیگر نشان داد دیکلوفناک هم بر روی کاسپاز اولیه ۸ و هم بر روی کاسپاز اولیه ۹، در سلول سرطانی خون تأثیرگذار است و از این طریق سبب القای آپوپتوز گردیده است (۱۵). هم‌چنین، زنک و همکاران اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین بر رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که داروی اگزالی پلاتین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در

(H1299) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سمیت سلولی ترکیب فوق وابسته به دوز است و توانایی القاء آپوپتوز را دارد (۱۸). در مطالعه حاضر، ترکیب ۲۵۰ میکروگرم از دیکلوفناک به همراه دوزهای مختلف از اگزالی پلاتین، اثر سایتوتوکسیک بیشتری نسبت به تیمار اگزالی پلاتین را به تنهایی بر روی سلول‌های SW480 شاهد بودیم و غلظت مهار میانه اگزالی پلاتین در این حالت از ۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت. در این مطالعه، میزان دیکلوفناک را ثابت در نظر گرفته و با غلظت‌های مختلف اگزالی پلاتین ترکیب شد.

از محدودیت‌های این تحقیق، این است که غلظت‌های متفاوت دیگری از دو دارو نیز با نسبت‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد و از الگوریتم‌های متفاوت دیگری برای ترکیب دو دارو استفاده گردد. همچنین می‌توان دو دارو را به صورت جداگانه و با فاصله زمانی بر روی سلول‌ها تیمار کرد و آثار و نتایج آن را نیز مورد بررسی قرار داد. به دنبال این مطالعه بررسی‌های بیشتری برای شناخت الگوی بیان این ژن‌ها و اثبات این که آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن می‌تواند مدرکی باشد برای نقش آن در پاسخ سرطان به درمان صورت گیرد، پیشنهاد می‌شود. همچنین علاوه بر تست‌های موجود برای ارزیابی بیان ژن در سطح RNA تست‌های مربوط به اندازه‌گیری پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز نیز مثل BAX و BID و Akt و غیره نیز بررسی گردد.

میلی‌لیتر بیشترین اثر سمیت سلولی را دارد. نسبت بیان ژن‌های آپوپتوزیس کاسپاز ۳ و ۹ به ژن مرجع در رده سلولی HT29 تیمار شده با اگزالی پلاتین به ترتیب به میزان ۲/۷ و ۳/۲ افزایش یافت (۱۶). تاکنون پژوهش‌های مختلفی در جهت استفاده از داروی اگزالی پلاتین در درمان انواع سرطان‌ها انجام شده است که نتایج این پژوهش‌ها با مطالعه حاضر هم‌سو بوده است. در یک مطالعه، ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی نانوذله‌های حاوی داروی اگزالی پلاتین روی سلول‌های سرطان کولون (HT29) را بررسی کردند. نتایج این پژوهش پتانسیل بالای نانوذله‌ها در کاهش ۱۶/۳۹ درصدی زنده مانی رده سلولی سرطان کولون را نشان داد. همچنین پژوهش‌های مختلف نشان داده است که می‌توان در ترکیب با عوامل شیمی درمانی سایتوتوکسیک برای فعالیت ضد سرطانی بیشتر، از عوامل سینرژیسیم و ترکیب داروهای دیگر استفاده کرد (۱۶) شیشنگ و همکاران اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین را به همراه ترکیب ۳-متیل آدنین مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه با استفاده از روش MTT، اثرات سمیت سلولی داروی فوق‌الذکر را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن یک مهار کننده اتوفاژی به رژیم‌های فعلی با اگزالی پلاتین منجر به افزایش اثرات درمانی شده است (۱۷). تکسیرا و همکاران اثرات سمیت سلولی داروی اگزالی پلاتین را به همراه پیریدینیل کربوکساماید، بر روی رده سلولی سرطان ریه (NCI-

## نتیجه‌گیری

آزمایشگاه که در مراحل انجام این تحقیق کمک شایانی نمودند تقدیر و تشکر نمایند.

نتایج این پژوهش نشان داد که دیکلوفناک می‌تواند در محیط کشت سلولی موجب اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی SW480 شده، همچنین ترکیب توأم دیکلوفناک و اگزالی پلاتین اثرات مهاری بیشتری نسبت به اگزالی پلاتین به تنهایی روی سلول‌های سرطانی کولورکتال SW480 دارد و باعث افزایش بیان ژن های caspas8 و caspas9 گردیده است در نتیجه با توجه به نتایج به دست آمده ترکیب این دو دارو ممکن است نتایج بهتری نسبت به استفاده از اگزالی پلاتین به تنهایی داشته باشد و بتوان دوز کمتری از اگزالی پلاتین را به کار برد و شاهد عوارض کمتری بود. بنابراین در صورتی که پروسه بالینی این ترکیب دارویی تأیید شود، می‌تواند در موارد بالینی برای بیماران مبتلا به سرطان کولون به کار گرفته شوند. بر این اساس بررسی احتمالی کاربرد داروی دیکلوفناک در درمان سرطان کولورکتال حایز اهمیت است.

## تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره دکتری عمومی رشته داروسازی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1399.135 واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مسئولین محترم

## REFERENCES

1. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F, Capellá G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* 2010; 16(1): 3-10.
2. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 2015; 34(3): 1087-96.
3. Zhang N. Ceramide: Therapeutic potential in combination therapy for cancer treatment. *Curr Drug Metab* 2015; 17(1): 37-51.
4. Lee SK, Min SP, Myeong JN. Aspirin has antitumor effects via expression of calpain gene in cervical cancer cells. *Journal of Oncology* 2008; 1(2): 8-12.
5. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
6. Amanda B, Parrish Christopher D. Freel, and Sally Kornbluth. 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: 1-24.
7. Culy CR, Clemett D, Wiseman LR. Adis Drug Evaluations-Oxaliplatin: A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs* 2000; 60(4): 895-924.
8. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies.
9. Zhang N. Ceramide: Therapeutic potential in combination therapy for cancer treatment. *Curr Drug Metab* 2015; 17(1): 37-51.
10. Dubios RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Putte L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-73.
11. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(11): 2155-67.
12. Inoue A, Muranaka S, Fujita H, Kanno T, Tamai H, Utsumi K. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: Dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome and caspase pathway. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(8): 1290-9.
13. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol* 2011; 18(1): 18-25.
14. Raez LE, Kobina S, Santos ES. Oxaliplatin in first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2010; 11(1): 18-24.
15. Yonesi B, Mirzaie A, Aliasgari E. Cytotoxicity and apoptotic effect of oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) and analysis of caspase 3 and caspase 9 gene expression using Real Time PCR method. *Journal of Cell & Tissue* 2017; 8(4): 364-73.
16. Zeng CUF, Cheng X. Preparation and evaluation of oxaliplatin thermosensitive liposomes with rapid release and high stability. *Plos One* 2016; 11(7): e0158517.
17. Shisheng T, Xingchen P, Wen P, Yinglan Z, Yuquan W. Enhancement of oxaliplatin-induced cell apoptosis and tumor suppression by 3-methyladenine in colon cancer. *Oncol Lett* 2015; 9(5): 2056-62.
18. Teixeira SF, de Azevedo RA, Silva AC, Braga RC. Evaluation of cytotoxic effect of the combination of a pyridinyl carboxamide derivative and oxaliplatin on NCI-H1299 human non-small cell lung carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 2016; 84: 1019-28.

# Evaluation the Effects of Diclofenac and Oxaliplatin on the Expression of Caspase8 and Caspase9 Genes in Colorectal Cancer Cell Line(SW480)

Hashemzadeh M<sup>1</sup>, Naji T<sup>1\*</sup>, Ahmadi R<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran, <sup>2</sup>Department of physiology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

Received: 29 Jan 2021 Accepted: 17 Jan 2022

## Abstract:

**Background & aim:** Apoptosis induction is one of the basic goals in the production of anticancer drugs. Evaluation of the relationship between non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and apoptosis in cancer cells is promising. Therefore, the aim of the present study was to determine the combination of oxaliplatin and diclofenac drugs on the expression of caspase 8 and 9 genes in colorectal cancer cell line (SW480) using Real Time PCR.

**Methods:** In the present experimental study conducted in 2019, SW480 colorectal cancer cells were treated with different concentrations of oxaliplatin and diclofenac, as well as a combination of diclofenac and oxaliplatin. The MTT method was used to check cell viability and the median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was obtained for each group, and the real-time PCR method was used to evaluate the expression of Caspase 8 and Caspase 9 genes. The collected data were analyzed using SPSS software and one-way variance statistical test and t-test.

**Results:** In oxaliplatin treatment with SW480 cells, concentrations of 25, 50, 100 and 200 µg / ml significantly reduced the viability of this category compared to the control (p<0.001). And median inhibition concentration of 65 µg / ml was calculated. In the treatment of cells with diclofenac, concentrations of 1000,500,250 µg / ml significantly reduced the viability of this category compared to controls (p<0.001), concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg / ml. Oxaliplatin in combination with 250 µg of diclofenac significantly reduced the viability of this class compared to the control (p<0.001) and the median inhibition concentration calculated with diclofenac equivalent to 32 µg / ml. Also, the combined treatment of diclofenac and Oxaliplatin led to a very significant increase in the expression of genes caspase8 and caspase9. (p<0.001) so that the expression of Caspase 8 gene increased about 3.7 times and Caspase9 expression increased about 1.8 times compared to the control in this experiment.

**Conclusion:** Diclofenac in combination with oxaliplatin can cause more cytotoxic effects compared to oxaliplatin alone in sw480 cancer cells. And if these two drugs are combined, a lower dose of oxaliplatin is needed to achieve this goal. The combination of diclofenac and oxaliplatin is associated with increased expression of caspase 8 and caspase 9 genes. As a result, it is essential to investigate the possible use of diclofenac with oxaliplatin in the treatment of colon cancer.

**Keywords:** Apoptosis, Caspase, Colorectal cancer, Diclofenac, Oxaliplatin

---

\*Corresponding author: Naji T, Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
Email: tnaji2002@gmail.com

**Please cite this article as follows:** Hashemzadeh M, Naji T, Ahmadi R. Evaluation the Effects of Diclofenac and Oxaliplatin on the Expression of Caspase8 and Caspase9 Genes in Colorectal Cancer Cell Line(SW480). Armaghane-danesh 2022; 27(3): 305-320.