

تأثیر دو داروی آتورواستاتین و آسپرین بر فنوتیپهای سلولهای سرطانی کبد در مدل کشت سلولی

فرشید سعادت (PhD)^۱، شبنم پویا (PhD)^۲، فرناز صفوی فر (MD)^۳، آذر برهمه (MD)^۴، محمود جلالی (PhD)^۵، محمدرضاخرمی زاده (PhD)^{۶*}

- ۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان
- ۲- گروه تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه ایالتی کالیفرنیا، آمریکا
- ۳- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵- گروه تغذیه سلولی و مولکولی دانشکده علوم تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۶- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی-مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۹۶/۲/۲۳، اصلاح: ۹۶/۴/۳۰، پذیرش: ۹۶/۵/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، بیماری های مرتبط با کبد یکی از دلایل ابتلا به سرطان کبد می باشند. ابداع روشها و ترکیبات دارویی جدید منجر به افزایش قابل توجه توانایی ما در درمان سرطانها می گردد. این تحقیق با هدف بررسی مقایسه ای اثر دو ترکیب دارویی شناخته شده آتورواستاتین و آسپرین بر فنوتیپهای سلولهای مدل سرطان کبد انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی پس از تهیه رده سلولی HepG2 از بانک سلولی ایران و کشت آن، اثرات سابتوتوکسیک، آپوپتوتیک و متاستاتیک دو داروی آتورواستاتین و آسپرین هر کدام در غلظتهای ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرو مولار در ۷ گروه تحت تیمار و یک گروه کنترل به ترتیب وسیله آزمونهای MTT، فلوسایتومتتری و زایموگرافی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج این آزمونها بیانگر اثرات سابتوتوکسیک آتورواستاتین در تمامی غلظتهای ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرو مولار (۴۸٪، ۹۶/۹۹٪ و ۱۰۰ درصد) و اثرات سابتوتوکسیک اندک آسپرین در تمامی مقادیر به جز در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بود که عمدتاً بصورت نکروز مشاهده گردید ($p < 0.05$). در مورد هر دو ترکیب القای آپوپتوز در یک غلظت مشخص به صورت موجی آغاز شد و استفاده همزمان این دو ترکیب، فرآیند آپوپتوز را از ۶/۸ و ۳/۲۲ به ترتیب برای استاتین و آسپرین به ۲۰/۲۲ افزایش داده است ($p < 0.05$). بررسی فعالیت آنزیم MMP-2 به عنوان آنزیم کلیدی در متاستاز، نشاندهنده کاهش این فنوتیپ بود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده توأم دو ترکیب آتورواستاتین و آسپرین قابلیت القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی را در غلظت های پایین می باشد.

واژه های کلیدی: آتورواستاتین، آسپرین، سرطان هیاتوسلولار، متاستاز، ماتریکس متالوپروتئیناز.

مقدمه

فعالیت پروتئولیتیک گروه خاصی از آندوپپتیداز (ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ یا MMP2) توسط سلولهای سرطانی نقش مهمی در عوارض هیاتوسلولار کارسینوما و متاستاز دارد (۶و۷). ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) پروتئازهایی هستند که ماتریکس خارج سلولی را تجزیه نموده و با مهارکننده های درون زا کنترل می شوند. در فرآیندهای پاتولوژیک، بیان و فعالیت این نوع آنزیمهای پروتئولیز به واسطه ترشح سیتوکین های پیش التهابی افزایش می یابد که نتیجه آن تشدید التهاب خواهد بود. در سالهای اخیر در خصوص نقش مهم متالوپروتئینازها در فرآیندهایی چون رگ زایی و گسترش سلولهای سرطانی مطالعات متعددی صورت گرفته و تولید ترکیباتی با قابلیت مهار این ساختارها جایگاه ویژه ای در تحقیقات ایفا می کند. روشهای درمانی مختلفی اعم از شیمی

یکی از علل مرگ و میر مبتلایان به دیابت نوع ۲ (Type 2 Diabetes Mellitus)، بیماری های مزمن کبد نظیر بیماری کبد چرب غیر الکلی است. فرم شدید این بیماری با ایجاد نارسایی کبدی و در نهایت سرطان کبد (Hepatocellular Carcinoma=HCC)، مرگ و میر مبتلایان را موجب می گردد(۱). یافته های حاصل از مطالعات متعدد در کشورهای پیشرفته، نشاندهنده بروز کارسینوم هیاتوسلولار حتی پیش از بروز سیروز در حدود پنجاه درصد بیماران مبتلا به بیماری کبد چرب غیر الکلی است که چالش جدیدی را در فرآیند تشخیص سریعتر ایجاد می کند(۲). علیرغم پیشرفتهای بسیار در زمینه بیولوژی مولکولی، سازوکارهای مولکولی موثر در مراحل ایجاد تومور و متاستاز در این سرطان به وضوح شناخته نشده است (۳-۵). مطالعات نشان داده اند که

□ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۷۷۱۸ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر محمدرضا خرمی زاده

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، مرکز تحقیقات بیوسنسور. تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۲۷

درمانی و پرتودرمانی جهت درمان این بیماری پیشنهاد شده اند (۸ و ۹). استاتین و مشتقات آن به عنوان مهارکننده رقابتی CoA-HMG ردوکتاز در کارآزمایی بالینی اثرات خود را در کنترل چربی های خون نشان داده اند. این ترکیبات، جهت پیشگیری و یا کاهش خطرات بیماریهای قلبی-عروقی، علیرغم افزایش ترانس آمیناز کبدی در طب بالینی تجویز می گردند (۱۰).

در خصوص تاثیر استاتینها در بدخیمی ها گزارشات متناقضی وجود دارد. برخی آنها را غیر موثر دانسته و گروهی، اثرات مثبتی را روی انواع سرطان مثلا لنفوم و ملانوما نشان داده اند (۱۷-۱۱). از دیگر داروهای شناخته شده می توان از آسپرین به عنوان یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) نام برد که بعنوان ضد درد و تب تجویز می گردد. همچنین در مقادیر کم به علت اثرات ضد انعقادی، جهت جلوگیری از سکنه های قلبی و مغزی کاربرد دارد. این ترکیب به صورت غیر انتخابی آنزیم سیکلو اکسیژناز را مهار می کند. آسپرین در حال حاضر پر مصرفترین داروی مصرفی در جهان بوده و برخی از مطالعات بیانگر کاهش خطر شیوع سرطان کولورکتال و فقدان اثر در سایر سرطان ها نظیر سرطان ریه می باشد (۱۹ و ۱۸). همچنین Li و همکاران نشان دادند که آسپرین در بیماران مبتلا به HCC اثرات مفیدی را نشان می دهد (۲۰). به دلیل تنوع عوامل موثر در پاتوژنز HCC و افزایش شیوع و مرگ و میر ناشی از آن، تحقیق در خصوص یافتن داروهایی که با سازوکارهای گوناگون بر این مسئله فایز آید، به شدت مورد توجه می باشد. عمده ترکیبات دارویی موجود، به خصوص در مقادیر مورد استفاده در درمان؛ اثرات سایتوتوکسیک شدید و غیر اختصاصی داشته و در خصوص برخی دیگر نظیر استاتین ها گزارشات متناقضی دیده می شود. یکی از راهکارهای بالقوه استفاده ترکیبی با مقادیر کمتر خواهد بود. لذا این تحقیق با هدف بررسی اثر ترکیب دارویی آتورواستاتین و آسپرین بر فنوتیپهای سلولهای سرطانی و سنجش مهارکنندگی آنها بر میزان تکثیر سلولهای سرطانی و متالوپروتئینازها انجام گردید.

مواد و روشها

کشت سلولی: این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ۷۱۸ بر روی سلولهای رده HepG2 در آزمایشگاه سلولی انجام گردید. سلولهای مدل سرطان کبد از بانک سلولی ایران واقع در انستیتو پاستور تهران خریداری شد. بوسیله آزمونهای MTT، فلوسایتومتری و زایموگرافی MMP-2 به ترتیب متغیرهای مطالعه یعنی اثرات سایتوتوکسیک، آپوپتوتیک و ژلاتینولیتیک در غلظتهای ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرو مولار ترکیبات دارویی یعنی آسپرین و آتورواستاتین به تنهایی و با هم در ۷ گروه تحت تیمار و یک گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. براساس استاندارد برای گروههای کنترل و مواد ارزیابی شونده حداقل سه تا پنج چاهک استفاده گردید. ترکیبات خالص دارویی آتورواستاتین و آسپرین از شرکت دارو پخش ایران خریداری شده و در حلال رقیق شده DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Merck, USA) بصورت محلول درآمدند.

زیست پذیری سلولی با استفاده از آزمون MTT: مدل سلولی سرطان کبد یعنی سلولهای رده HepG2 در آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری و در محیط کشت RPMI 1640

(Gibco, USA) حاوی ۵ درصد سرم جنین گوساله (Gibco, USA) و مخلوط آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین (Gibco, USA) در انکوباتور کشت سلولی در شرایط حرارتی ۳۷ درجه سانتیگراد، فشار گاز CO2 ۵ درصد و رطوبت اشباع کشت داده شد. آزمون سایتوتوکسیسیته براساس مطالعه Khoramizadeh و همکاران انجام شد (۲۱). تعداد ده هزارسلول در پلیت ۹۶ خانه کشت و در هفت گروه تحت تیمار با محلول آتورواستاتین و آسپرین در غلظتهای ۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرومولار بمدت یک شب در انکوباتور قرار گرفتند گروه کنترل فاقد دارو بود. سپس محیط کشت سلولها با محیط تازه حاوی محلول تترازولیو بروماید با غلظت ۵ mg/mL تعویض گردید. سلولها در محیط جدید به مدت سه ساعت قرار گرفته و سپس محیط رویی دور ریخته و یک صد میکرولیتر ایزوپروپانل به جای آن در حفرات پلیت ریخته شد. نهایتا رنگ محیط در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری شد.

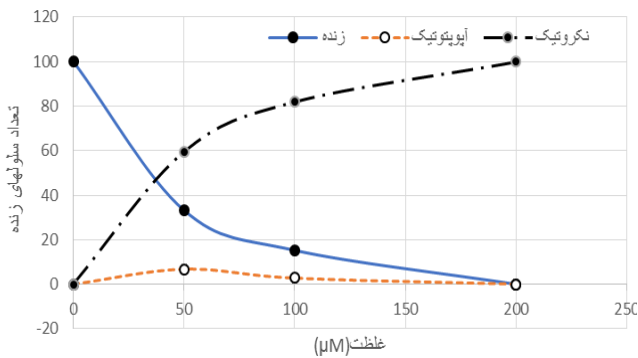
ارزیابی فعالیت آنزیم ژلاتیناز با روش زایموگرافی: آزمون زایموگرافی جهت ارزیابی نیمه کمی فعالیت آنزیم ژلاتیناز نوع یک (MMP-2) انجام گرفت. نمونه های حاصل از سوپ رویی سلولهای تحت آزمایش در ژل پلی اکریلامید ۷ درصد کولیمبریزه با ژلاتین یک درصد الکتروفورز شدند. سپس ژل بمدت یک شب در محلول حاوی کلسیم و روی که فعال کننده آنزیم ژلاتیناز هستند، قرار داده شد. بعد از بیست و چهار ساعت، ژل با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی و سپس با مخلوط حلال اتانول و آب رنگبری شد. ژلها سپس با استفاده از دستگاه Gel Documentation (UVP) عکسبرداری شده و نهایتا با استفاده از نرم افزار دانسیتومتری (UK)UViTech مورد آنالیز کمی بر اساس معیار Grey scale قرار گرفت (۲۱) نتایج حاصل بصورت نمودارهای ستونی نشان داده شده است.

بررسی فلوسیتومتریک مرگ برنامه ریزی شده سلولی با Annexin-v: آزمون آپوپتوز با استفاده از کیت (Annexin-v (ROCHE, Germany) بر اساس روش فلوسایتومتری انجام شد. سلولها پس از تیمار فیکس شده و سپس با استفاده از محلول ماده فوق که با FITC کنژوگه شده بود همزمان با محلول رنگ Propidium Iodide که بمنظور ردیابی سلولهای نکروتیک بکار میرود توسط دستگاه فلوسایتومتر (Partech, USA) مورد ارزیابی اسپکتروفلورومتری قرار گرفتند. نتایج خوانده شده توسط نرم افزار دستگاه برای آنالیزهای مقایسه ای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تفاوت در رشد سلول های تحت تیمار و فعالیت ژلاتیناز حاصل از سه آزمون مستقل با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ به روش T-Test مورد بررسی قرار گرفت و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافتهها

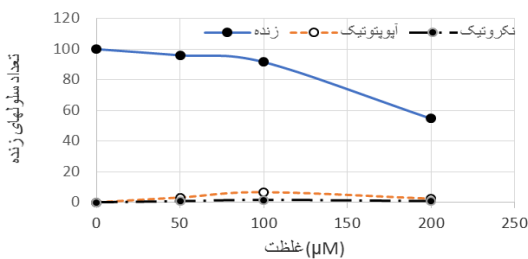
نتایج حاصل از زیست پذیری سلولی با استفاده از آزمون MTT: جهت بررسی اثرات سایتوتوکسیک آتورواستاتین و آسپرین، سلولهای Hep-G2 تحت تیمار با غلظت های مختلف این ترکیبات قرار گرفته و آزمون MTT انجام شد (نمودار ۱). با افزایش غلظت آتورواستاتین درصد سلولهای زنده به ۵۰، ۰/۴ و صفر کاهش یافت. بر مبنای نتایج IC₅₀ آتورواستاتین، پنجاه میکرومولار می باشد. همچنین متعاقب تیمار سلول با آسپرین در غلظت های مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار، درصد سلولهای زنده به ترتیب ۱۰۰، ۹۴/۷ و ۷۳/۷ بوده که تفاوت بین غلظت ها این دو ترکیب به لحاظ آماری معنی دار است ($p < 0.05$).

نتایج مرگ برنامه ریزی شده سلولهای Hep-G2 در برابر مقادیر مختلف داروها: نتایج فلوسایتومتری تیمار سلول HepG2 با استاتین در دوزهای مختلف (۰-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرومولار) نشان داد که متعاقب تیمار شیمیایی، با افزایش غلظت دارو درصد سلولهای نکروتیک افزایش یافته، بطوریکه در غلظت ۲۰۰ میکرومولار آتورواستاتین تمامی سلولها از بین می روند. این کاهش تعداد در کلیه غلظتهای ۰-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرومولار به ترتیب ۳۳/۲، ۲۳/۱۵ و صفر بوده که نسبت به غلظت صفر به لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p < 0.05$). همچنین مشخص شد که این ترکیب در القا مرگ برنامه ریزی شده سلولی چندان موثر نبود به طوریکه با افزایش غلظت دارو درصد سلولهای دچار آپوپتوز به ترتیب ۶/۸۰، ۲/۷۷ و صفر می باشد (نمودار ۳).



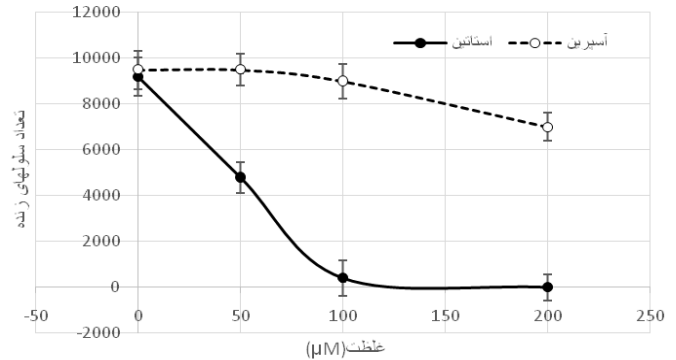
نمودار ۳. بررسی درصد سلولهای دچار آپوپتوز و نکروزیس از تیمار با غلظتهای مختلف آتورواستاتین. با افزایش غلظت استاتین میزان آپوپتوز کاهش می یابد. تفاوت آماری معنی داری در نکروز و آپوپتوز سلول های Hep-G2 در کلیه غلظت های آتورواستاتین مشاهده می شود ($p < 0.05$).

تیمار سلولی HepG2 با آسپرین در غلظت های مختلف (۰-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرومولار) تاثیر ناچیزی در فرآیندهای چون نکروز و آپوپتوز از خود نشان داده و در فقط غلظتهای بالا موجب مرگ سلولها می گردد (نمودار ۴). بر اساس نتایج حاصله از تیمار سلول رده سرطانی HepG2 با مقادیر مختلف آتورواستاتین و آسپرین، ترکیب این دو به میزان پنجاه میکرو مولار از هر کدام مورد استفاده قرار گرفت. استفاده توأم این دو ترکیب مرگ برنامه ریزی شده سلولی را به شدت القا نموده و این میزان در مقایسه با استاتین تا سه برابر افزایش می یابد. این افزایش به لحاظ آماری معنی دار می باشد (نمودار ۵) ($p < 0.05$).



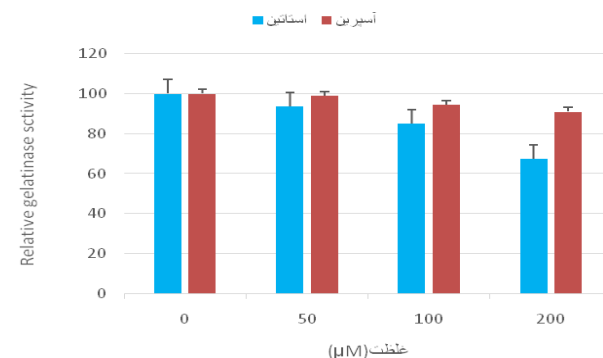
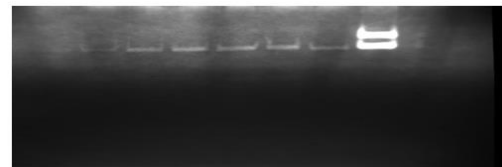
نمودار ۴. بررسی درصد سلولهای دچار آپوپتوز و نکروزیس از تیمار با غلظتهای مختلف آسپرین. با افزایش غلظت آسپرین میزان آپوپتوز به صورت موجی تغییر یافته هر چند که تفاوت آماری معنی داری در نکروز و آپوپتوز سلول های Hep-G2 در کلیه غلظت های آسپرین مشاهده نمی شود.

ارزیابی نتایج فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (MMP-2) پس از انکوباسیون سلولهای Hep-G2 با روش زایموگرافی: جهت مطالعه اثرات ترکیبات دارویی آسپرین و آتورواستاتین بر فعالیت MMP-2 مقادیر مختلف این ترکیبات بر مدل سلول رده سرطانی HepG2 تاثیر داده شد. متعاقب تیمار شیمیایی، سطح فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ کاهش پیدا کرد و این تغییرات از طریق آنالیز دانسیته کلیشه های ژل زایموگرم و بر مبنای سطح متوسط زیر منحنی محاسبه شد. این کاهش در غلظت ۲۰۰ میکرومولار برای آتورواستاتین معنی دار بود (نمودار ۲) ($p < 0.05$).



نمودار ۱. بررسی اثرات سایتوتوکسیک آتورواستاتین و آسپرین در غلظتهای مختلف بر سلولهای Hep-G2. همانطور که در نمودار مشاهده می شود با افزایش غلظت آتورواستاتین تعداد سلولهای زنده به صورت وابسته به دوز کاهش می یابد در صورتیکه که آسپرین تا مقدار یک صد میکرومولار بر سلولهای Hep-G2 اثر کشندگی معنی داری ندارد.

Atorvastatin Aspirin
 ۲۰۰ ۱۰۰ ۵۰ UT ۵۰ ۱۰۰ ۲۰۰ ST



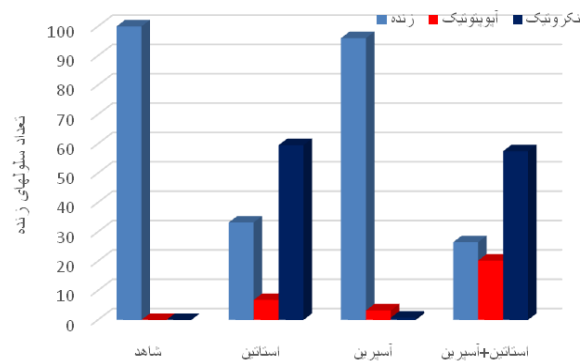
نمودار ۲. تاثیر آسپرین و آترو واستاتین بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۲. پانل الف: آنالیز الکتروفوریتیک فعالیت ژلاتیناز ۲ حاصل از تیمار سلولها با آتورواستاتین و آسپرین با غلظتهای (۰-۵۰-۱۰۰-۲۰۰ میکرومولار، UT (تیمار نشده) و ST (کنترل استاندارد) پانل ب- نتایج اثر تیمار شیمیایی سلولها با آسپرین و آترو واستاتین بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (MMP-2) با استفاده از تکنیک زایموگرافی. کاهش فعالیت ژلاتیناز ۲ در غلظت ۲۰۰ میکرومولار آتورواستاتین نسبت به کنترل معنی دار بود ($p < 0.05$).

اثرات این ترکیبات بر فنوتیپ متاستاز با استفاده از ارزیابی فعالیت آنزیم ژلاتیناز ۲ بدست آمد، نشان‌دهنده بیشترین اثرات مهارى در مورد اتورواستاتین (در غلظت ۲۰۰ میکرو مولار) و کمترین اثرات مهار کنندگی در مورد آسپرین بود. این یافته با نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققین از این نظر همخوانی دارد که استاتین بر MMP-9 تاثیرى نداشته و از افزایش ترشح MMP-2 جلوگیری می‌کند (۲۷و۲۸). نتایج آزمون آپوپتوز- نکروز با تکنیک فلوسایتومتري نشان می‌دهد که تاثیر اتورواستاتین در القای مرگ سلولى در تمامی غلظتها تفاوت معنی داری را با نمونه های تیمار نشده دارد، هر چندکه این تاثیر عمدتاً بصورت مرگ سلولى غیرآپوپتوتیک بروز می‌نماید. البته در غلظت ۵۰ میکرومولار میزان آپوپتوز در مقایسه با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بیشتر بود. این یافته همسو با برخی مشاهدات است که سرکوب مسیره‌های Ras/ERK و Ras/mTOR در القای آپوپتوز حاصل از استاتین را موثر می‌دانند (۱۴).

در مورد آسپرین، بطور کلی پدیده مرگ سلولى اعم از نکروز و یا آپوپتوز بسیار کم بوده و به تدریج با افزایش غلظت مشاهده می‌گردد که با مشاهدات سایر محققین همخوانی دارد (۲۹و۳۰). بر خلاف تیمار با اتورواستاتین، در آسپرین درصد سلولهای آپوپتوتیک در مقایسه با سلولهای نکروتیک به صورت یک موج در یک غلظت افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابند. این کاهش در ارتباط با استاتین وابسته به غلظت است اما به نظر می‌رسد که آسپرین در مقادیر بالا از طریق دیگری نظیر اتوفاژی موجب مرگ سلول می‌شود (۳۱) از طرفی استفاده توام این دو ترکیب، با مقادیری به مراتب کمتر، مرگ برنامه ریزی شده سلولى را تا سه برابر افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، توانایی القای مرگ برنامه ریزی شده سلولى توسط ترکیب توام استاتین و آسپرین در غلظت پنجاه میکرومولار بطور معنی داری افزایش یافته است. این افزایش نسبت به آسپرین و استاتین به ترتیب هفت و سه برابر می‌باشد. ویژگی اصلی بیماری سرطان چند انشعابی بودن آن است بنابراین بهتر است در تحقیقات، نسل جدیدی از داروها طراحی شوند که بتوانند بدون ایجاد سمیت برای سلول های سالم بدن میزبان، چندین هدف را به طور همزمان در سلول های سرطانی تحت تاثیر قرار دهند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.



نمودار ۵. نتایج آنالیز مرگ برنامه ریزی شده سلولى در غلظت پنجاه میکرومولار از اتورواستاتین و آسپرین. تفاوت آماری معنی داری در آپوپتوز سلولهای Hep-G2 در استفاده توام استاتین و آسپرین در مقایسه با هر یک از دو ترکیب به صورت جداگانه مشاهده می‌شود ($p \leq 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان دهنده توانایی القای مرگ برنامه ریزی شده سلولى توسط ترکیب اتورواستاتین و آسپرین در غلظت های پایین می‌باشد. بطوریکه استفاده توام این دو ترکیب مرگ برنامه ریزی شده سلولى را در مقایسه با استاتین تا سه برابر افزایش می‌دهد. به دلیل قابلیت تکثیر نامحدود سلول های سرطانی و میزان بالای تولید اسیدهای نوکلئیک و پروتئین، این سلول ها ضمن فرار از فرایند آپوپتوز پتانسیل تهاجم به بافتهای مجاور و در نهایت استقرار در محل های ثانویه را دارند. استاتین های مختلف اثرات متفاوتی بر روی HCC بروز می‌دهند (۲۲). یافته های Simon و همکاران موید کاهش پنجاه درصدی در HCC بیماران متلا به هیپاتیت C بوده (۲۳) در صورتیکه Lai و همکاران آن را حدود بیست و هشت درصد تخمین زده اند (۲۴). مطالعه حاضر، اثرات دو ترکیب اتورواستاتین و آسپرین را بر روی یکی از شناخته شده ترین مدل‌های سلولى به تنهایی و در کنار هم بطور مقایسه ای بررسی نموده تا بتوان با دید بهتری در مورد نقش ضد سرطانی این ترکیبات اظهار نظر نمود. نتایج آزمونهای سایتوتوکسیسیته نمایانگر اثرات شدید سایتوتوکسیک اتورواستاتین در مقایسه با آسپرین بود. یافته های ما در مدل سلول HepG2 تاییدگر اثرات سایتوتوکسیک اتورواستاتین حتی در غلظتهای کم بوده است، که توسط مطالعات Leszczynska و همکاران نیز تایید می‌گردد (۲۵). از سویی این یافته با نتایج پیشین در مورد اثرات سایتوتوکسیک داروهای (NSAIDs) هماهنگی دارد (۲۶). آنچه که در مورد

A Study of the Effect of Aspirin and Atorvastatin on the Phenotypes of Liver Cancer Cells in a Cell Culture Model

F. Saadat (PhD)¹, Sh. Pooya (PhD)², F. Safavifar (MD)³, A. Berahmeh (MD)⁴,
M. Jalali (PhD)⁵, M.R. Khorramizadeh (PhD)^{6*}

1.Department of Immunology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, I.R.Iran.

2.Department of Nutrition and Food Sciences, California State University, California, USA.

3.Endocrinology Metabolism Research Institute Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

4.Department of Pathobiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

5.Department of Cellular and Molecular Nutrition, Faculty of Nutritional Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

6.Research Center of Biosensor, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(10); Oct 2017; PP: 7-13

Received: May 13th 2017, Revised: Jul 21th 2017, Accepted: Aug 11th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In patients with type 2 diabetes, liver diseases are the major causes of liver cancer. The invention of new methods and medicinal compounds has led to a significant increase in our ability to treat cancers. This study aims to evaluate the effect of two known compounds, atorvastatin and aspirin, on the phenotypes of liver cancer cell lines.

METHODS: In this experimental study, after preparing HepG2 cell line from National Cell Bank of Iran and culturing it, the cytotoxic, apoptotic and metastatic effects of both atorvastatin and aspirin were investigated at concentrations of 50 – 100 – 200 µM in 7 treatment groups and one control group by MTT assay, flow cytometry and zymography tests.

FINDINGS: The results of these tests indicated the cytotoxic effects of atorvastatin at all concentrations of 50 – 100 – 200 µM (48%, 99.96% and 100%), and the low cytotoxic effects of aspirin at all concentrations except for 200 µM, mainly observed as necrosis ($p < 0.05$). In both compounds, apoptosis induction was initiated at a specific concentration and the simultaneous use of these two compounds increased the apoptosis from 6.8 and 3.22, respectively for atorvastatin and aspirin, to 20.22 ($p < 0.05$). Investigating the activity of the MMP-2 enzyme as a key enzyme in metastases indicated a decrease in this phenotype.

CONCLUSION: The results of this study showed that co-administration of both atorvastatin and aspirin compounds is capable of inducing programmed cell death at low concentrations.

KEY WORDS: *Atorvastatin, Aspirin, Hepatocellular carcinoma, Metastasis, Matrix metalloproteinase.*

Please cite this article as follows:

A Study of the Effect of Aspirin and Atorvastatin on the Phenotypes of Liver Cancer Cells in a Cell Culture Model. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(10):7-13.

* Corresponding author: M.R. Khorramizadeh (PhD)

Address: Endocrinology and Metabolism Research Center, Biosensor Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 88220037

E. mail: khoramza@tums.ac.ir

References

1. Sumida Y, Seko Y, Yoneda M. Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). Novel antidiabetic medications for nonalcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes. *Hepato Res.* 2017; 47(4):266-80.
2. Kolly P, Dufour JF. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with NASH. *Diagnostics (Basel).* 2016; 6(2):22.
3. Wang Z, Li Z, Ye Y, Xie L, Li W. Oxidative stress and liver cancer: Etiology & Therapeutic targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:7891574.
4. Panebianco C, Oben JA, Vinciguerra M, Paziienza V. Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signalings. *Clin Exp Med.* 2016.
5. Balogh J, Victor D, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, et al. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma.* 2016; 3:41-53.
6. Li Z, Takino T, Endo Y, Sato H. Activation of matrix metalloproteinase (MMP)-9 by membrane-type-1 matrix metalloproteinase/MMP-2 axis stimulates tumor metastasis. *Cancer Sci.* 2017; 108(3):347-53.
7. Wu SM, Lin SL, Lee KY, Chuang HC, Feng PH, Cheng WL, et al. Hepatoma cell functions modulated by NEK2 are associated with liver cancer progression. *Int J Cancer.* 2017; 140(7):1581-96.
8. Townsend AR, Chong LC, Karapetis C, Price TJ. Selective internal radiation therapy for liver metastases from colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2016; 50:148-54.
9. Kanda T, Masuzawa T, Hirai T, Ikawa O, Takagane A, Hata Y, et al. Surgery and imatinib therapy for liver oligometastasis of GIST: a study of Japanese Study Group on GIST. *Jpn J Clin Oncol.* 2017;47(4):369-72.
10. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW Jr, García FA, et al. Statin use for the primary prevention of cardiovascular disease in adults: us preventive services task force recommendation statement. *JAMA.* 2016; 316(19):1997-2007.
11. Bonovas S, Filioussi K, Tsavaris N, Sitaras NM. Statins and cancer risk: A literature-based meta-analysis and meta-regression analysis of 35 randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2006;24(30):4808-17.
12. Friedman GD, Achacoso N, Fireman B, Habel LA. Statins and reduced risk of liver cancer: evidence for confounding. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(10).
13. Friis S, Poulsen AH, Johnsen SP, McLaughlin JK, Fryzek JP, Dalton SO, et al. Cancer risk among statin users: a population-based cohort study. *Int J Cancer.* 2005;114(4):643-7.
14. Tsubaki M, Fujiwara D, Takeda T, Kino T, Tomonari Y, Itoh T, et al. The sensitivity of head and neck carcinoma cells to statins is related to the expression of their Ras expression status, and statin-induced apoptosis is mediated via suppression of the Ras/ERK and Ras/mTOR pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(2):222-34.
15. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis.* 2005;26(5):883-91.
16. Wang T, Seah S, Loh X, Chan CW, Hartman M, Goh BC, Lee SC. Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget.* 2016;7(3):2532-44.
17. Sarabayrouse G, Pich C, Teiti I, Tilkin-Mariame AF. Regulatory properties of statins and rho gtpases prenylation inhibitors to stimulate melanoma immunogenicity and promote anti-melanoma immune response. *Int J Cancer.* 2017;140(4):747-55.
18. Friis S, Riis AH, Erichsen R, Baron JA, Sørensen HT. Low-dose aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drug use and colorectal cancer risk: a population-based, case-control study. *Ann Intern Med.* 2015; 163(5):347-55.
19. Maddison P. Effects of aspirin on small-cell lung cancer mortality and metastatic presentation. *Lung Cancer.* 2017; 106:67-69.

- 20.Li JH, Wang Y, Xie XY, Yin X, Zhang L, Chen RX, Ren ZG. Aspirin in combination with TACE in treatment of unresectable HCC: a matched-pairs analysis. *Am J Cancer Res.* 2016;6(9):2109-16.
- 21.Khorramizadeh MR, Hosseinzadeh S, Safavifar F, Saadat F, Aalizadeh N, Falak R, et al. Interaction of CpG-oligodeoxynucleotides with Toll like receptor 9 induces apoptosis and modulates metalloproteinase-2 activity in human intestinal epithelium. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2007;6(3):107-14.
- 22.Higashi T, Hayashi H, Kitano Y, Yamamura K, Kaida T, Arima K, et al. Statin attenuates cell proliferative ability via TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 2016 ;33(11):123.
- 23.Simon TG, Bonilla H, Yan P, Chung RT, Butt AA. Atorvastatin and fluvastatin are associated with dose-dependent reductions in cirrhosis and hepatocellular carcinoma, among patients with hepatitis C virus: Results from ERCHIVES. *Hepatology.* 2016;64(1):47-57.
- 24.Lai SW, Liao KF, Lai HC, Muo CH, Sung FC, Chen PC. Statin use and risk of hepatocellular carcinoma. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(6):485-92.
- 25.Leszczynska A, Gora M, Plochocka D, Hoser G, Szkopinska A, Koblowska M, et al. Different statins produce highly divergent changes in gene expression profiles of human hepatoma cells: a pilot study. *Acta Biochim Pol.* 2011; 58(4):635-9.
- 26.Saadat F, Khorramizadeh MR, Mirshafiey A. Apoptotic efficacy and inhibitory effect of dexamethasone on matrix metalloproteinase. *Med Sci Monit.* 2005;11(7):253-7.
- 27.Ferretti G, Bacchetti T, Banach M, Simental-Mendía LE, Sahebkar A. Impact of Statin Therapy on Plasma MMP-3, MMP-9, and TIMP-1 Concentrations. *Angiology.* 2016: 3319716688301.
- 28.Yang Q, Qi X, Dang Y, Li Y, Song X, Hao X. Effects of atorvastatin on atrial remodeling in a rabbit model of atrial fibrillation produced by rapid atrial pacing. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016;16(1):142.
- 29.Ding JH, Yuan LY, Chen GA. Aspirin enhances the cytotoxic activity of bortezomib against myeloma cells via suppression of Bcl-2, survivin phosphorylation of AKT. *Oncol Lett.* 2017;13(2):647-54.
- 30.Roh JL, Kim EH, Jang H, Shin D. Aspirin plus sorafenib potentiates cisplatin cytotoxicity in resistant head and neck cancer cells through xCT inhibition. *Free Radic Biol Med.* 2017;104:1-9.
- 31.Zhao Q, Wang Z, Wang Z, Wu L, Zhang W. Aspirin may inhibit angiogenesis and induce autophagy by inhibiting mTOR signaling pathway in murine hepatocarcinoma and sarcoma models. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2804-10.