Amygdalin may potentiate the effects of lapatinib on SK-BR-3 cancer cell death through increasing Bax expression

Bahman Moradipoodeh[1]
1.Associate Professor, Department of Laboratory Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.
Tell: 09116198046, E. Mail: bmoradipoodeh@yahoo.com. ORCID ID: 0000-0002-0430-666X

ABSTRACT

Background and Aim: : HER-2 Positive breast cancer is one of the aggressive types of cancer and is resistant to chemotherapy drugs such as lapatinib .Amygdalin is a natural compound found in the seeds of fruits such as apricot, peache, apple and almond .In recent years, antitumor effects of amygdalin have been reported in different types of cancer cells. The present study aimed to investigate the cytotoxic effectes of amygdalin in combination with lapatinib, on cell viability and Bax expression in SK-BR-3 breast cancer cell line as a cell line with high expression of HER-2.

Material and Methods: After cell culture we evaluated the survival of SK-BR-3 cells by MTT after 48 hours of treatment with different concentrations of amygdalin and lapatinib alone and in combination. The pre-apoptotic Bax expression level was measured by western blot method.

Results: Amygdalin and lapatinib significantly decreased survival of SK-BR-3 cells in a dose-dependent manner. The simultaneous use of amygdalin with lapatinib showed that amygdalin enhanced the lethal effect of lapatinib. Also, amygdalin at the concentration of 10 mg/ml increased the effects of 200 nM lapatinib on the expression of Bax protein.

Conclusion: This study showed that the amygdalin-lapatinib combination could be effective for breast cancer patients with HER-2 overexpression. However, more studies are recommended to obtain more definitive results.

Keywords: Lapatinib, Amygdalin, Breast cancer, Bax promoter, SK-BR-3 cell line
Received: July 31, 2022 **Accepted:** Nov 27, 2022

How to cite the article: Bahman Moradipoodeh Amygdalin may potentiate the effects of lapatinib on SK-BR-3 cancer cell death through increasing Bax expression.ŚJKU 2023;28(3):1-12.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

آمیگدالین ممکن است از طریق افزایش بیان Bax باعث تقویت اثرات لاپاتینیب در مرگ سلول‌های سرطانی SK-BR-3 می شود

بهمن مرادی پوده[1]

۱.استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران. پست الکترونیک: bmoradipoodeh@yahoo.com، تلفن: ۰۹۱۱۶۱۹۸۰۴۶
کد ارکید: 0000-0002-0430-666X

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه HER-2 مثبت یکی از انواع سرطان تهاجمی است و به داروهای شیمی‌درمانی مانند لاپاتینیب مقاوم است. آمیگدالین یک ترکیب طبیعی است و در مغز میوه‌هایی مثل زردآلو، هلو، سیب و بادام تلخ یافت می‌شود. در سال‌های اخیر اثرات ضد توموری آمیگدالین در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک آمیگدالین در ترکیب با لاپاتینیب بر روی زنده ماندن سلولی و بیان Bax در رده سلولی سرطان سینه پستان SK-BR-3 به‌عنوان یک رده سلولی با بیان بالای HER-2 انجام شد.

مواد و روش ها : پس از کشت سلول‌ها، بقای سلولی سلول‌های SK-BR-3 با روش MTT پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف آمیگدالین و لاپاتینیب به تنهایی و به صورت ترکیبی ارزیابی شد. سطح بیان پروتئین پیش‌آپوپتوز Bax با روش وسترن‌بلات اندازه‌گیری شد.

یافته ها: آمیگدالین و لاپاتینیب توانستند بقای سلولی SK-BR-3 را به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. استفاده هم‌زمان از تیمار آمیگدالین با لاپاتینیب نشان داد که آمیگدالین اثرات کشندگی لاپاتینیپ را تقویت کرده است. همچنین آمیگدالین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، باعث تشدید در اثرات غلظت ۲۰۰ نانومولار لاپاتینیب بر روی میزان بیان پروتئین Bax شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که ترکیب آمیگدالین-لاپاتینیب ممکن است کاندیدای ارزشمندی برای بیماران مبتلا به سرطان پستان با بیان بیش‌ازحد HER-2 باشد، هرچند برای نتیجه‌گیری قطعی مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: لاپاتینیب، آمیگدالین، سرطان سینه، پروتئین Bax، رده سلولی SK-BR-3

وصول مقاله:۱۴۰۱/۵/۹ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۸/۹ پذیرش:۱۴۰۱/۹/۶

مقدمه

یکی از بزرگ‌ترین مشکلات سلامت بشری و از شایع‌ترین علل بروز مرگ‌ومیر در سراسر جهان بیماری سرطان است. متأسفانه شیوع سرطان در همه کشورها و به‌خصوص در کشورهای توسعه‌یافته در حال افزایش است (۲, ۱). یکی از انواع سرطان‌ها، سرطان پستان است که علیرغم پیشرفت دانش پزشکی هنوز در سراسر جهان یکی از شایع‌ترین نوع از بدخیمی در خانم‌ها است (۳). اخیراً با پیشرفت تکنیک مولکولی، بین میزان بیان برخی از ژن‌ها و ایجاد بدخیمی‌ها از جمله سرطان پستان ارتباط معنی‌داری مشخص شده است. این ارتباط عامل مهمی برای تشخیص صحیح‌تر و دقیق‌تر و همچنین عامل مهمی برای تعیین پیش‌آگهی و درمان این بدخیمی‌ها است (۴, ۵). خانواده فاکتور رشد مشتق از اپیدرم (EGFR) که جز گیرنده‌های تیروزین-کینازی است نقش مهمی در رشد، زنده ماندن، چسبندگی، مهاجرت و تمایز سلول‌ها دارد. این گیرنده‌ها دارای چهار عضو گذرنده از غشا ($EGFR(ErbB_1)$، $HER_2(ErbB_2)$، $HER_3(ErbB_3)$، $HER_4(ErbB_4)$) هستند که دارای خاصیت تیروزین‌کینازی می‌باشند. این گیرنده‌ها در سلول‌های نرمال با ارسال سیگنال‌های درون‌سلولی باعث تنظیم تکثیر، بقا، چرخه سلولی و رگ-زایی می‌شوند. از میان این گیرنده‌ها، فقط گیرنده HER-2 فاقد لیگاند مشخص است؛ اما سایر گیرنده‌ها به لیگاندهایی مثل فاکتورهای رشد متصل گردند. مشاهده شده است که بیان و سیگنالینگ بیش‌ازحد HER2 با انواع گسترده‌ای از انواع سرطان‌ها مثل سرطان پستان همراه است. گیرنده HER-2 وقتی فعال می‌شود که این گیرنده با خودش و یا با سایر گیرنده‌های این خانواده به صورت دیمر در آید. با دیمر شدن این گیرنده، ریشه تیروزین داخل سلولی فسفریله و فعال می‌گردد (۶-۸). به‌طور تقریبی در ۲۵ درصد از سرطان‌های پستان افزایش بیان پروتئین HER2 وجود دارد. افزایش بیان گیرنده HER2 موجب لقاء تغییر شکل سلولی - شده و در سرطان پستان با دوره تهاجمی‌تر بیماری مرتبط است که در رگ‌زایی، افزایش تکثیر سلولی و درنهایت تهاجم تومور نقش دارد (۱۰, ۹). درمان‌های رایج سرطان مثل جراحی، پرتو درمانی، شیمی‌درمانی، هورمون درمانی و تارگت‌درمانی علیرغم اثرات مفیدی که دارند؛ ولی دارای محدودیت اثر و عوارض جانبی متعددی می‌باشند (۱۱, ۱۰). داروهای لاپاتینیب و تراستوزوماب از طریق مهار کردن گیرنده HER2 به‌طور روتین در درمان سرطان پستان با بیان بالای این گیرنده استفاده می‌شوند. لاپاتینیب یک داروی ضد تکثیر خوراکی است که برای درمان سرطان پستان و سایر تومورهای جامد استفاده می‌شود. این دارو از طریق مهار کردن تیروزین کیناز HER2، مانع فسفریلاسیون و فعال‌سازی این گیرنده می‌شود و از این طریق می‌تواند پروتئین‌های سیگنال دهنده اصلی پایین‌دست آن‌ها مانند Akt و کینازهای تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی (ERKs) را سرکوب کند (۱۳, ۱۲). اکثر داروهای شیمی‌درمانی باعث القای آپپتوز می‌شوند و از این طریق باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که لاپاتینیب می‌تواند از طریق افزایش دادن بیان پروتئین‌های پیش‌برنده آپپتوزی Bax، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ و همچنین کاهش دادن بیان پروتئین‌های ضد آپپتوزی Bcl-2 باعث القای آپپتوز می‌گردد(۱۴, ۱۵). فرار کردن از آپپتوز با مکانیسم‌های مختلف، یکی از ویژگی‌های مشترک سلول‌های سرطانی است. (۱۶). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 به‌شدت در مسیر آپوپتوز داخلی که اغلب در پاسخ به عوامل شیمی‌درمانی تحریک می‌شود، درگیر هستند. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 مانند Bax و Bcl-2 به ترتیب دارای فعالیت‌های پیش‌برنده آپوپتوز و ضد آپوپتوز هستند (۱۸, ۱۷). کشف و توسعه داروهای جدید ضد سرطان به دلیل مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی‌درمانی رایج، یک موضوع کلیدی برای درمان سرطان به شمار می‌آید. به همین دلیل محققین در تلاش هستند تا با استفاده از مواد طبیعی موجود در بخش‌های مختلف گیاهان به‌عنوان مکمل‌های داروهای شیمی‌درمانی، میزان استفاده از

داروهای شیمی‌درمانی و درنتیجه عوارض ناشی از آن را کاهش دهند (۱۹). آمیگدالین (D-مندلونیتریلD-β گلوکوزید ۶-β گلوکوزید) یک ترکیب طبیعی است که مغز میوه‌هایی مثل زردآلو، هلو، سیب و بادام تلخ یافت می‌شود. این ترکیب اغلب به‌طور سنتی توسط بیماران مبتلا به سرطان مورداستفاده قرار می‌گیرد. هرچند در مورد خواص ضد توموری آن اطلاعات ضدونقیضی وجود دارد و طرفداران و منتقدانی برای مصرف آمیگدالین وجود دارد؛ ولی در سال‌های اخیر مطالعات نشان داده‌اند که آمیگدالین باعث آپوپتوز سلول‌های سرطانی مثل لوسمی پرومیولتیک، سرطان پروستات، سرطان سرویکس و کبد و سرطان پستان از راه‌های مختلفی مثل افزایش دادن میزان آپپتوز سلول‌های سرطانی می‌گردد (۲۰-۲۲). با توجه به اثرات ضد توموری که از آمیگدالین در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی گزارش شده است، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک آمیگدالین در ترکیب با لاپاتینیب بر روی زنده ماندن سلولی و بیان Bax در رده سلولی سرطان سینه پستان SKBR3 به‌عنوان یک رده سلولی HER2 بیان بیش‌ازحد انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه پودر آمیگدالین (A6005)، پودر MTT و آنتی بیوتیک های پنی سیلین-استرپتومایسین از شرکت Sigma، محیط کشت DMEM و همچنین FBS از شرکت Gibco، آنتی‌بادی مونوکال خرگوشی آنتی Bax (ab32503) از شرکت Abcam، آنتی‌بادی مونوکال خرگوشی آنتی بتا-اکتین (ab32503) و آنتی‌بادی ضد خرگوشی IgG لیبل شده با HRP (4970L) از شرکت Cell Signaling، همچنین کیت ECL از شرکت Bio-Rad و همچنین رده سلولی SK-BR-3 از موسسه پاستور ایران خریداری شدند.

شرایط کشت سلولی:

رده سلولی سرطان پستان SK-BR-3 از انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) با گلوکز بالا و سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و ۰٫۵٪ پنی سیلین-استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵٪ کشت داده شدند.

کشت سلولی و سنجش سمیت سلولی

تقریباً ۷×۱۰^{۳} از سلول‌های SK-BR-3 در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. به‌منظور اتصال سلول‌ها به ته چاهک، این سلول‌ها به صورت شبانه انکوبه شدند. برای ارزیابی اثر سیتوتوکسیک آمیگدالین و لاپاتینیب، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف آمیگدالین (۸۰-۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و لاپاتینیب (۵۰-۶۰۰ نانومولار) به تنهایی و به صورت ترکیبی به مدت ۴۸ ساعت، تیمار شدند. حلال هر دو این مواد محیط کشت بدون سرم است. سلول‌های گروه کنترل بدون تیمار باقی ماندند. پس از ۴۸ ساعت تیمار، محیط کشت رویی خارج شد و سپس میزان۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. محلول اضافه‌شده به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه شد تا کریستال‌های بنفش‌رنگ در چاهک‌ها ایجاد گردد. در انتها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی متیل سولفوکسید (DMSO) برای حل کردن کریستال‌ها به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. بعد از حل شدن کریستال-ها، میزان جذب نوری سلول‌ها با دستگاه الایزا ریدر BioTek ELX800 (Winooski، ایالات‌متحده) در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

وسترن بلاتینگ:

پس از اتمام مدت زمان تیمار سلول‌ها، پلیت‌های حاوی سلول‌ها از انکوباتور به روی یخ منتقل شد. محیط رویی سلول‌ها ابتدا به‌طور کامل با سمپلر برداشت شد و سپس سلول‌ها به آرامی با PBS سرد و استریل شستشو داده شدند.

از بافر لیز کننده حاوی مهارکننده پروتئاز برای استخراج پروتئین استفاده شد. به این صورت که به هر پلیت ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده اضافه شد و به‌خوبی بر روی سطح سلول‌ها پخش شد به‌گونه‌ای که تمام سلول‌ها از کف پلیت جدا شدند. با جمع‌آوری سلول‌های جداشده از کف پلیت و انتقال آن به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۲۰ دقیقه با دور۱۶۰۰۰rpm در دمای۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و محلول رویی موجود در میکروتیوب برای تعیین غلظت پروتئین به روش لوری استفاده شد. بعد از اندازه-گیری غلظت پروتئین، نمونه‌های پروتئین (۵۰ میکروگرم) بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) تحت الکتروفورز قرار گرفتند و بعد از پایان یافتن الکتروفورز این نمونه‌ها به غشای PVDF منتقل شدند. بعد از تمام شدن فرایند انتقال از ژل به غشا، غشای حاوی پروتئین‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق در بافر مسدودکننده skim milk ۵ درصد قرار داده شد تا جایگاه‌های غیراختصاصی مسدود شده و آنتی‌بادی در مراحل بعد فقط به پروتئین موردنظر متصل شود. پس از پایان مرحله بلاکینگ، غشا سه بار با بافر TBST1X در هر بار ۱۰ دقیقه شستشو داده شد تا برای اتصال آنتی‌بادی موردنظر آماده شود. پس از اتمام شستشو، غشا درون محلول آنتی‌بادی اولیه آنتی‌بادی ضد Bax اولیه (با رقت ۱ به ۲۰۰۰) و ضد بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی (با رقت ۱ به ۲۰۰۰) به صورت شبانه در دمای ۴ درجه همراه با شیک آهسته انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون، غشا سه بار با TBST (هر بار۱۰ دقیقه) شستشو داده شد و سپس به مدت یک ساعت با محلول آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با آنزیمHRP در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. بعد از شستشوی مجدد غشا با TBST (۳ بار و هر بار ۱۰ دقیقه)، غشا به مدت ۲ دقیقه در مجاورت محلول‌های کیت ECL (به نسبت ۱ به ۱) قرار گرفت و سپس با قرار دادن آن درون دستگاه کمی‌داک (Chemi doc)، باندهای پروتئینی موردنظر ظاهر شدند.

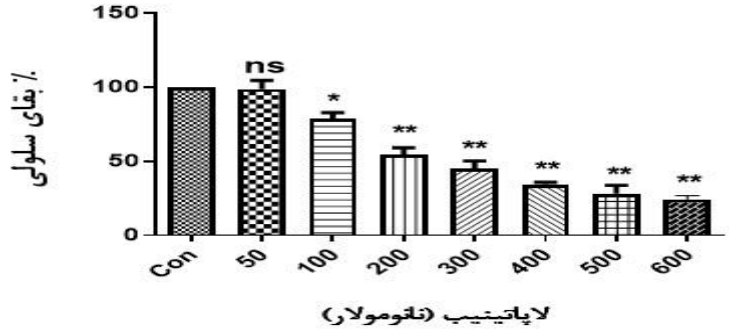
تحلیل آماری:

تمام آزمایش‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد. برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (Chicago, IL, USA) استفاده شد. مقایسه آماری میانگین بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. همه مقادیر به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (S.E.M) بیان شدند و در تمامی مقایسه‌ها $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر سیتوتوکسیک لاپاتینیب بر سلول‌های SKBR-3

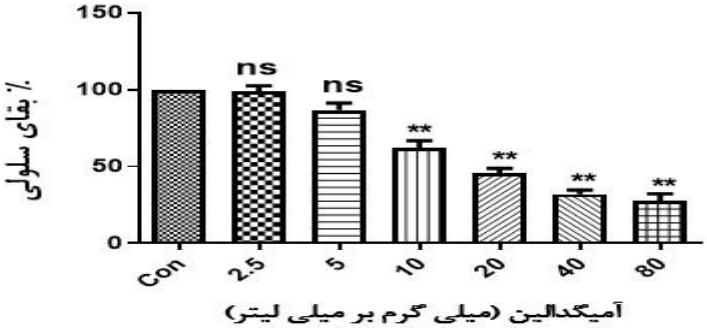
همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده‌شده است لاپاتینیب بر زنده ماندن سلولی دارای اثر مهاری است. این اثر مهاری در غلظت ۱۰۰ نانومولار لاپاتینیب در ۴۸ ساعت تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. با افزایش دادن غلظت لاپاتینیب، درصد میزان زنده ماندن سلولی کاهش نشان داد که این امر نشان دهنده اثرات وابسته به دوز لاپاتینیب بر میزان زنده ماندن رده سلولی SK-BR-3 است.



شکل ۱. اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی لاپاتینیب بر روی بقای سلولی سلول‌های SK-BR-3. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از لاپاتینیب به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با روش MTT تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده اند. (ns: عدم معنی‌داری، $p < 0.01$ * و $p < 0.001$ *)

اثر آمیگدالین بر میزان بقاء سلول در رده سلولی SK-BR-3:

همان گونه که در شکل ۲ نشان داده‌شده است آمیگدالین بر زنده ماندن سلولی دارای اثر مهاری است. این اثر مهاری در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمیگدالین در ۴۸ ساعت تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. با افزایش دادن غلظت آمیگدالین، درصد میزان زنده ماندن سلولی کاهش نشان داد که این امر نشان دهنده اثرات وابسته به دوز آمیگدالین بر میزان زنده ماندن رده سلولی SK-BR-3 است.

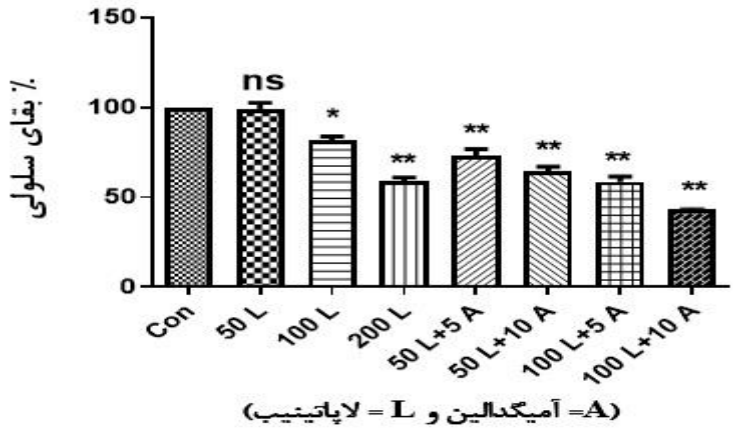


شکل ۲. اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی آمیگدالین بر روی بقای سلولی سلول‌های SK-BR-3. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از آمیگدالین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با روش MTT تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده اند. (ns: عدم معنی‌داری و $p < 0.001$ **)

اثر تیمار هم زمان لاپاتینیب و آمیگدالین بر بقای سلولی رده SK-BR-3

در این مرحله از آزمایش به بررسی اثرات آمیگدالین (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) در تشدید اثرات دوزهای پایین لاپاتینیب (۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) پرداخته شد. به همین منظور سلول‌های SK-BR-3 به صورت همزمان با آمیگدالین و لاپاتینیب به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و میزان بقا سلول ها با تست MTT ارزیابی شد. نتایج حاصل اثرات تیمار همزمان آمیگدالین و لاپاتینیب بر بقا سلول‌های SK-BR-3 در شکل ۳ آورده شده است. نتایج به دست آمده از آزمایش فوق نشان داد که بقا سلول‌های SK-BR-3 در گروه تیمار شده به صورت همزمان با غلظت ۵ میلی‌گرم بر

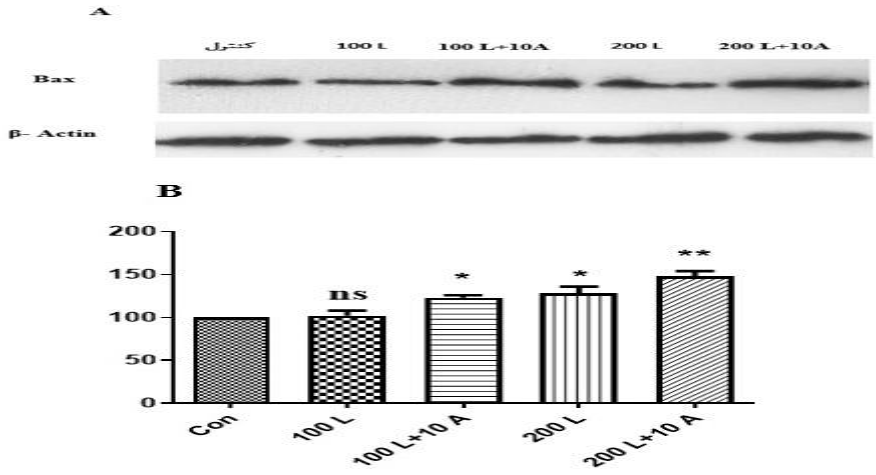
میلی‌لیتر آمیگدالین با غلظت ۵۰ نانومولار لاپاتینیب نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری داشت. این در حالی است که بقای این رده سلولی در تیمار با غلظت ۵۰ نانومولار لاپاتینیب نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نداشت. همین‌طور در غلظت ۱۰۰ نانومولار لاپاتینیب هم آمیگدالین باعث افزایش در میزان مرگ سلولی شده و اثرات کشندگی لاپاتینیپ را تقویت کرده است.



شکل ۳. اثر سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی تیمار هم زمان لاپاتینیب با آمیگدالین بر روی بقای سلولی سلول‌های SK-BR-3.
سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از لاپاتینیب و آمیگدالین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با روش MTT تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده اند. (ns: عدم معنی‌داری، $p < 0.01$ * و $p <$ ** 0.001)

اثر لاپاتینیب و آمیگدالین بر میزان بیان پروتئین Bax

سلول‌های SK-BR-3 در مدت زمان ۴۸ ساعت با غلظت-های۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار لاپاتینیب به تنهایی و به‌طور هم‌زمان با غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمیگدالین تیمار شدند. پس از اتمام زمان تیمار، پروتئین این سلول ها استخراج گردید و میزان بیان پروتئین Bax با روش وسترن بلاتینگ انجام شد. نتایج حاصل در شکل ۴ نشان داده‌شده است. نتایج نشان داد که لاپاتینیب در غلظت ۱۰۰ نانومولار اثر آماری معنی‌داری بر روی میزان بیان پروتئین Bax ندارد؛ اما وقتی‌که سلول ها به‌طور هم زمان با غلظت ۱۰۰ نانومولار لاپاتینیب و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمیگدالین تحت تیمار قرار گرفتند، باعث افزایش معنی‌دار میزان پروتئین Bax شدند. همچنین آمیگدالین در غلظت۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر باعث تشدید در اثرات غلظت ۲۰۰ نانومولار بر روی میزان بیان پروتئین Bax شد.



شکل ۴. اثر در شرایط آزمایشگاهی تیمار هم زمان لاپاتینیب با آمیگدالین بر روی میزان بیان پروتئین Bax در سلول‌های SK-BR-3. سلول‌ها با غلظت‌های مشخص‌شده از لاپاتینیب و آمیگدالین به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. بیان پروتئین Bax روش وسترن بلاتینگ تعیین شد. داده‌ها از سه آزمایش مستقل به دست آمده که به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده اند. (ns: عدم معنی‌داری، $p < 0.05$ * و $p < 0.01$ **)

بحث

اختلال در عملکرد ژن HER-2، یکی از اختلالات رایج در سرطان پستان است. از دیدگاه بالینی دو مانع اصلی، در استفاده از داروهای مهارکننده HER2 در تومورهای سرطان پستان با بیان بالای HER-2 وجود دارد. اول اینکه اثرات داروهای مهارکننده HER-2 به دلیل مقاومت دارویی اکتسابی و ذاتی به وجود آمده در سال اول شروع درمان به‌شدت محدود می‌شود. دوم به دلیل ارتباط مستقیم HER-2 با سلامت سیستم قلب و عروق، پزشکان می‌بایست با دقت بالایی از داروهای مهارکننده HER-2 استفاده نمایند (۲۴, ۲۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهد مهار HER-2 و تحریک هم‌زمان آپپتوز می‌تواند راهکار نوین و موفقیت‌آمیزی در درمان سلول‌های سرطانی به‌حساب آید (۲۶, ۲۵). در سال‌های اخیر به منظور بالا بردن راندمان درمان و کاهش اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی، راهکارهای درمانی مبتنی بر ترکیب داروهای شیمی‌درمانی با ترکیبات طبیعی بسیار مورد توجه قرارگرفته است (۲۷, ۲۸). باوجوداینکه مطالعات متعدد اثرات آمیگدالین بر روی مرگ و آپپتوز سلول‌های سرطانی را بررسی کرده‌اند، مطالعه‌ای در زمینه استفاده هم‌زمانی آمیگدالین و لاپاتینیب در رده سلولی SK-BR-3 صورت نگرفته است؛ بنابراین ما در این مطالعه اثر داروهای مذکور به تنهایی و در ترکیب باهم بر میزان بقا سلول و سطح بیان پروتئین Bax را موردبررسی و آزمایش قراردادیم. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که تیمار سلول‌های SK-BR-3 با آمیگدالین و لاپاتینیب به صورت وابسته به غلظت اثرات چشمگیری در کاهش سطح بقای سلول‌های این رده گذاشت. همچنین نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد با پایین آوردن غلظت لاپاتینیب در تیمار ۴۸ ساعت و از آن سو بالا بردن غلظت آمیگدالین تا غلظت پایین‌تر از ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان بقا سلول در مقایسه با تیمار تنهای لاپاتینیب و حتی تیمار تنهای آمیگدالین در زمان ۴۸ ساعت، کاهش چشمگیری نشان داد. علاوه بر این نتایج ما نشان می‌دهد تیمار هم‌زمانی داروهای آمیگدالین و لاپاتینیب بر سلول‌های SK-BR-3 تأثیر مشهودتری نسبت به تیمار تنهای داروهای مذکور در افزایش سطح بیان پروتئین Bax می‌گذارد.

لاپاتینیب یک داروی صناعی است و توانایی مهار قابل‌برگشت مسیر تیروزین کینازی وابسته به HER-2 را

دارا است. این دارو در سرطان پستان با بیان بالای HER-2 مورداستفاده درمانی گسترده قرار دارد؛ اما با این حال مکانیسم دقیق فعالیت ضد توموری آن، مشخص نیست. هرچند مطالعاتی نشان داده‌اند که لاپاتینیب از طریق اتصال برگشت‌پذیر به پاکت متصل‌شونده به ATP در دمین تیروزین کینازی گیرنده‌های HER-2، از فسفریلاسیون این گیرنده‌ها جلوگیری کرده و از این طریق سرعت رشد تومور را کاهش می‌دهد (۱۲, ۲۹). همان‌طور که گفته شد، درمان-های مبتنی بر هدف قرار دادن گیرنده‌های HER2 به مرور زمان مقاومت دارویی ایجاد می‌کنند و باعث اختلال در روند درمان می‌شوند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد افزایش بیان رسپتور غشایی AXL نقش مهمی در ایجاد مقاومت دارویی در سرطان پستان HER-2 مثبت دارد. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Liu, Li و همکاران انجام شد نشان داد که رده سلولی BT474 که به لاپاتینب مقاوم شده بود، بیان بالای AXL دارد درصورتی‌که رده سلولی BT474 حساس به لاپاتینیب این ویژگی وجود نداشت. Liu, Li و همکاران طی این مطالعه نوعی siRNA با نام GSK1363089 طراحی کردند که توانست در رده BT474 مقاومت به لاپاتینیب را از بین ببرد(۳۰). اثرات ضد توموری آمیگدالین در مطالعات مختلف و در انواع مختلف تومورها مثل تومور پستان، کولون، ریه، پروستات و تخمدان نشان داده شده است. این اثرات ضد توموری ممکن است از طریق مکانیسم‌های مختلف مثل فعال‌سازی مسیر آپپتوز باعث گردد (۱۶, ۱۷, ۲۰, ۲۱). مسیرهای اصلی آپپتوز شامل مسیر داخلی و خارجی هستند که هر دو این مسیرها در مرگ سلول‌های سرطانی انسان نقش دارند. در میان چندین پروتئینی که در فرایند آپوپتوز دخیل هستند،دو پروتئین اصلی شامل کاسپازها و پروتئین‌های خانواده Bcl-2 نقش حیاتی دارند. خانواده Bcl-2 به دو زیر گروه پروتئین‌های پیش برنده آپپتوزی که شامل Bax و پروتئین-های مهارکننده آپپتوزی که شامل Bcl-2 تقسیم می‌شوند (۳۱, ۳۲). در مطالعه حاضر، آمیگدالین باعث تشدید اثر لاپاتینیب در بیان پروتئین Bax شد. در تائید نتایج ما، چندین مطالعه انجام‌شده این مطالعات نشان داده‌اند که آمیگدالین در تومورهای مختلف از جمله سرطان پروستات، سرطان سینه سه‌گانه منفی، سرطان دهانه رحم و کبد باعث مرگ سلولی می‌شود. اثرات مرگ سلولی آمیگدالین ممکن است از طریق فعال کردن مسیرهای داخلی و خارجی آپپتوز باشد. این مطالعات نشان داده‌اند که آمیگدالین باعث کاهش بیان پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 و همچنین افزایش بیان پروتئین پیش برنده آپپتوزی Bax و افزایش بیان انواع مختلف کاسپازهایی که در مسیرهای آپپتوز نقش پیش برنده اپپتوز را دارند می‌گردد. نتایج حاصل از مطالعه ما در تکمیل مطالعات پیشین مبنی بر اثر مهاری آمیگدالین (۳۳, ۲۱, ۲۰, ۱۷, ۱۶) و لاپاتینیب (۳۴-۳۶) بر تکثیر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی است. علاوه بر این تیمار هم‌زمان آمیگدالین و لاپاتینیب به‌طور چشمگیری میزان بقا سلول را در مقایسه با تیمار تنهای آن‌ها با داروهای فوق کاهش داد که این امر ممکن است به علت اثر تقویت‌کنندگی آمیگدالین بر بیان پروتئین‌های پیش‌برنده آپپتوزی مثل پروتئین Bax باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب آمیگدالین-لاپاتینیب در مقایسه با تیمار تنهای این داروها می‌تواند اثرات بیشتری بر روی بقای سلولی سلول‌های SK-BR-3 بگذارد. این اثرات ممکن است در ارتباط با افزایش سطح پروتئین Bax در رده سلولی SK-BR-3 باشد. این نتایج مزیت احتمالی ترکیب آمیگدالین -لاپاتینیب را برای مداخله در بیماران مبتلا به سرطان پستان با بیان بیش‌ازحد HER-2 تائید می-کند.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی (با شماره طرح ۹۷ s۵۰) با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، ایران انجام شد. نویسنده این مقاله از این حمایت مالی تشکر می‌کند.

منابع

1.Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. The lancet oncology. 2001;2(9):533-43.

2.Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(5):363-85.

3.DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(6):438-51.

4.Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland. 2005;205(2):248-54.

5.Kittaneh M, Montero AJ, Glück S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. Biomarkers in cancer. 2013;5:BIC. S9455.

6.Park HS, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. Modern pathology. 2014;27(9):1212-22.

7.Park K, Han S, Shin E, Kim H, Kim J. EGFR gene and protein expression in breast cancers. European Journal of Surgical Oncology (EJSO). 2007;33(8):956-60.

8.Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. Cancer discovery. 2013;3(2):224-37.

9.Seol H, Lee HJ, Choi Y, Lee HE, Kim YJ, Kim JH, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. Modern pathology. 2012;25(7):938-48.

10.Meng S ,Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(25):9393-8.

11.Sledge GW, Mamounas EP, Hortobagyi GN, Burstein HJ ,Goodwin PJ, Wolff AC. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. Journal of clinical oncology. 2014;32(19):1979.

12.Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, De Azambuja E, Aura C, et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. The Lancet. 2012;379(9816):633-40.

13.Bundred N, Porta N, Brunt AM, Cramer A, Hanby A, Shaaban AM, et al. Combined Perioperative Lapatinib and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer Identifies Early Responders: Randomized UK EPHOS-B Trial Long-Term Results. Clinical Cancer Research. 2022;28(7):1323-34.

14.Liu C, Cheng X, Xing J, Li J, Li Z, Jian D, et al. CIRBP-OGFR axis safeguards against cardiomyocyte apoptosis and cardiotoxicity induced by chemotherapy. International journal of biological sciences. 2022;18(7):2882.

15.Lewińska A, Wróbel K, Błoniarz D, Adamczyk-Grochala J, Wołowiec S, Wnuk M. Lapatinib-and fulvestrant-PAMAM dendrimer conjugates promote apoptosis in chemotherapy-induced senescent breast cancer cells with different receptor status. Biomaterials Advances. 2022;140:213047.

16.Moradipoodeh B, Jamalan M, Zeinali M, Fereidoonnezhad M, Mohammadzadeh G. In vitro and in silico anticancer activity of amygdalin on the SK-BR-3 human breast cancer cell line. Molecular Biology Reports. 2019;46(6):6361-70.

17.Moradipoodeh B, Jamalan M, Zeinali M, Fereidoonnezhad M, Mohammadzadeh G. Specific targeting of HER2-positive human breast carcinoma SK-BR-3 cells by amygdaline-ZHER2 affibody conjugate. Molecular Biology Reports. 2020;47(9):7139-51.

18.Chen Y-J, Yeh M-H, Yu M-C, Wei Y-L, Chen W-S, Chen J-Y, et al. Lapatinib–induced NF-kappaB activation sensitizes triple-negative breast cancer cells to proteasome inhibitors. Breast cancer research. 2013;15(6):1-14.

19.Berretta M, Della Pepa C, Tralongo P, Fulvi A, Martellotta F, Lleshi A, et al. Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) in cancer patients: An Italian multicenter survey. Oncotarget. 2017;8(15):24401.

20.Liczbiński P, Bukowska B. Molecular mechanism of amygdalin action in vitro: review of the latest research. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2018;40(3):212-8.

21.Shi J, Chen Q, Xu M, Xia Q, Zheng T, Teng J, et al. Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: a review. Cancer Medicine. 2019;8(6):3004-11.

22.Albogami S, Alnefaie A. Role of Amygdalin in Blocking DNA Replication in Breast Cancer In Vitro. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2021;22(12):1612-27.

23.Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. Journal of clinical oncology. 2002;20(5):1215-21.

24.Rexer BN, Arteaga CL. Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. Critical Reviews™ in Oncogenesis. 2012;17.(1)

25.Carpenter RL, Lo H-W. Regulation of apoptosis by HER2 in breast cancer. Journal of carcinogenesis & mutagenesis. 2013;2013(Suppl 7).

26.Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Torres-Garcia VZ, Sauri-Nadal T, Del Barco S, et al. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. Biochemical and biophysical research communications. 2011;407(2):412-9.

27.Reisfeld RA. The tumor microenvironment: a target for combination therapy of breast cancer. Critical Reviews™ in Oncogenesis. 2013;1(2-1).

28.Núñez C, Capelo JL, Igrejas G, Alfonso A, Botana LM, Lodeiro C. An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. Biomaterials. 2016;97:34-50.

29.Huang H-L, Chen Y-C, Huang Y-C, Yang K-C, Pan HY, Shih S-P, et al. Lapatinib induces autophagy, apoptosis and megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia K562 cells. PloS one. 2011;6(12):e29014.

30.Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. 2009;69(17):6871-8.

31.Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson Jr EM. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. The Journal of cell biology. 2002;157(3):441-53.

32.Fulda S, Debatin K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene. 2006;25(34):4798-811.

33.Park H-J, Yoon S-H, Han L-S, Zheng L-T ,Jung K-H, Uhm Y-K, et al. Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells. World journal of gastroenterology: WJG. 2005;11(33):5156.

34.Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. Molecular cancer therapeutics. 2007;6(2):667-74.

35.Gril B, Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Vega-Valle E, Feigenbaum L, et al. Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain. 2008;100(15):1092-103.
36.Guan M, Tong Y, Guan M, Liu X, Wang M, Niu R, et al. Lapatinib inhibits breast cancer cell proliferation by influencing PKM2 expression. 2018;17:1533034617749418.