

بررسی مکانیسم اثر انالاپریل، مهار کننده‌ی آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین (ACE)، بر تکثیر، آپوپتوز و مهاجرت سلول‌های سرطانی کولورکتال

اسما مصطفی پور^۱، جواد بهارآرا^۲، مجید خزاعی^۳، امیر آوان^۴، سید مهدی حسینیان مهر^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان کولورکتال، یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در ایران است. داروهای مهار کننده‌ی آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین، علاوه بر درمان فشار خون، در درمان سرطان مؤثر می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر انالاپریل بر تکثیر، مهاجرت و بیان ژن‌های ACE (Angiotensin-converting enzyme)، VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A)، AT1R (Angiotensin II type I receptor) و TGF-β1 بود که در رده‌های سلولی سرطان کولورکتال انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، اثر انالاپریل بر میزان بقای سلول‌های سرطان کولورکتال رده‌های HT29، CT26 و SW480 با استفاده از آزمون MTT، میزان مهاجرت سلول‌ها نیز به روش Migration assay مطالعه و بررسی چرخه‌ی سلولی با استفاده از فلوسایتومتری انجام شد. بیان ژن‌های MMP3 (Matrix metalloproteinase 3)، MMP9، E-cadherin، ACE، VEGF-A، TGF-β1 و AT1R با استفاده از تکنیک Real time polymerase chain reaction (PCR) و نیز گونه‌های فعال اکسیژن در این سه رده‌ی سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: انالاپریل دارای اثر ضد تکثیری و کاهشدهنده‌ی مهاجرت سلولی در هر سه رده‌ی سلولی سرطان کولورکتال در مقایسه با گروه شاهد بود. بیان ژن‌های E-cadherin، MMP3 و MMP9 پس از تیمار با انالاپریل به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش داشت ($P < 0.001$). بررسی بیان ژن‌های ACE، VEGF-A، TGF-β1 و AT1R، نشان دهنده‌ی کاهش معنی‌داری در سه رده‌ی سلولی بود و سطح گونه‌های فعال اکسیژن به طور معنی‌داری در سه رده‌ی سلولی در مقایسه با گروه شاهد افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات مختلف ضد سرطانی انالاپریل، می‌توان امیدوار بود این دارو، حداقل در کنار داروهای استاندارد شیمی درمانی، بتواند در درمان سرطان کولورکتال مفید واقع شود.

واژگان کلیدی: آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین؛ انالاپریل؛ سرطان کولورکتال

ارجاع: مصطفی پور اسما، بهارآرا جواد، خزاعی مجید، آوان امیر، حسینیان مهر مهدی. بررسی مکانیسم اثر انالاپریل، مهار کننده‌ی آنزیم تبدیل کننده‌ی آنژیوتانسین (ACE)، بر تکثیر، آپوپتوز و مهاجرت سلول‌های سرطانی کولورکتال. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۸۱): ۴۴۹-۴۴۲.

انواع داروها مانند ۵-فلوئوروراسیل (5-FU) و جراحی بر روی بیماران انجام می‌شود و به تازگی، از داروهای ترکیبی یا منوکلونال آنتی‌بادی استفاده می‌شود (۳).
سیستم رنین- آنژیوتانسین (RAS)، یک سیستم هورمونی است

مقدمه

سرطان کولورکتال، یکی از دلایل عمده و سومین عامل مرگ و میر در جهان است (۱) و سرعت بالای متاستاز آن، علت ۷۰ درصد از مرگ و میر این بیماران است (۲). درمان‌های شیمی درمانی با استفاده از

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
 - ۲- استاد، گروه زیست‌شناسی و مرکز پژوهشی جانور شناسی کاربردی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
 - ۳- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 - ۴- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 - ۵- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- نویسنده‌ی مسؤل: مجید خزاعی؛ استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: khazaeim@mums.ac.ir

روش‌ها

کشت سلول: در این تحقیق، رده‌های سلولی SW-480، CT26 و HT-29 مورد مطالعه قرار گرفتند. رده‌های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شدند. برای کشت رده‌ی سلولی Roswell Park Memorial Institute از محیط CT26 و SW-480 (RPMI) و برای کشت رده‌ی HT-29 از محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) استفاده شد. محیط‌های مورد استفاده جهت کشت سلول‌ها حاوی Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد بود. نگهداری سلول‌های سرطان کولورکتال در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و محیط حاوی ۵ درصد CO₂ انجام شد.

بررسی سمیت سلولی (روش MTT): مقدار ۱۰ هزار سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها، تیمار آن‌ها با انالاپریل با دزهای ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. به هر یک از چاهک‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در طی زمان نگهداری، MTT توسط سیستم سوسکینات دهیدروناز که یکی از آنزیم‌های چرخه‌ی تنفسی میتوکندری‌ها می‌باشد، احیا می‌شود و کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان را تولید می‌نماید. این کریستال‌ها، در آب غیر محلول می‌باشند و قبل از رنگ‌سنجی، باید توسط حلال Dimethyl sulfoxide (DMSO) به حالت محلول در آیند. بنابراین، پس از ۴ ساعت نگهداری در انکوباتور، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت، جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader خوانده شد (۳).

بررسی مهاجرت سلولی: به منظور بررسی رفتار مهاجرت سلولی سلول‌های SW480 و HT29 سرطان کولون، تیمار با استفاده از انالاپریل، روش Scratch assay به کار برده شد. تعداد ۲۰۰،۰۰۰ سلول SW480 و HT29 در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد و در روز بعد، توسط نوک سرسمپلر کف چاهک خراش داده شد و سپس، توسط بافر Phosphate buffered saline (PBS) شستشو انجام شد. تیمار با انالاپریل با دز Half maximal inhibitory concentration (IC50) به دست آمده از هر یک از رده‌های سلولی انجام شد. تا زمانی که فاصله‌ی ایجاد شده در بین سلول‌های گروه شاهد پر شود، تصویربرداری از چاهک‌های گروه‌های شاهد و تیمار شده با دارو طی زمان‌های مختلف انجام شد (۳).

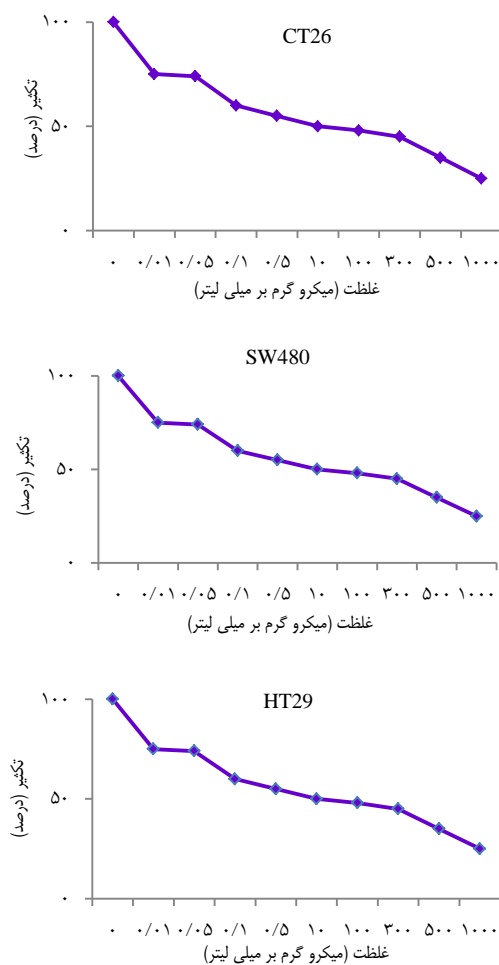
که در آن، سیگنالینگ پپتید فعال آنژیوتانسین ۲ (Ang II) تکثیر سلول را افزایش می‌دهد و رگ‌زایی را تحریک می‌کند (۴-۵). انالاپریل، به عنوان مهارکننده‌ی آنزیم تبدیل‌کننده‌ی آنژیوتانسین (Angiotensin-converting enzyme inhibitor یا ACEI)، از تبدیل آنژیوتانسین ۱ به آنژیوتانسین ۲ جلوگیری می‌کند و علاوه بر درمان فشار خون و نارسایی قلبی، در درمان سرطان نیز مؤثر می‌باشد. شواهد زیادی نشان می‌دهد که به کار بردن مهارکننده‌های ACE از جمله انالاپریل، دارای اثرات ضد توموری و ضد التهابی است (۶). انالاپریل، می‌تواند با هدف قرار دادن چندین مسیر سیگنالینگ سلولی نظیر TGF- β به عنوان عامل مهم تنظیمی سرکوب‌کننده‌ی تومور در سلول‌های اپی‌تلیال، تکثیر سلول را متوقف و مرگ سلولی را القا کند (۷). همچنین، در تمایز سلول، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و پاسخ ایمنی دخالت دارد (۸).

تحقیقات نشان دادند که مهارکننده‌های ACE گیرنده‌های TGF- β را تنظیم می‌کنند. گزارش شده است که آنژیوتانسین ۲، رشد بسیاری از بافت‌ها نظیر کلیه را تحریک می‌کند و با سایر عوامل رشد سلول به صورت هماهنگ عمل می‌کند (۹). فعالیت سیستم رنین-آنژیوتانسین (Renin-angiotensin system یا RAS) در نمو اولیه به طور برجسته‌ای افزایش می‌یابد که این نتایج، نشان می‌دهد آنژیوتانسین برای رشد طبیعی بافت‌ها مانند بافت کلیه مورد نیاز است و نیز به کار بردن مهارکننده‌ی ACE، بیان عوامل رشد ضروری نظیر TGF- β و VEGF را کاهش می‌دهد. همچنین، گزارش شده است که TGF- β در تشکیل مویرگ‌های گلوومرولی در طول نمو کلیه، نقش حیاتی دارد و به کار بردن مهارکننده‌های ACE، موجب مهار رگ‌زایی و مهار رشد می‌شود (۱۰).

اثرات بیولوژیکی TGF- β ، از طریق اتصال به گیرنده‌های خاص سلول اعمال می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها، گیرنده‌های نوع ۱، ۲ و ۳ هستند. این گیرنده‌ها در بیشتر سلول‌ها شناسایی شده‌اند و برای اتصال TGF- β به گیرنده‌ی نوع ۱، گیرنده‌ی نوع ۲ مورد نیاز است؛ در حالی که برای انتقال پیام، گیرنده‌ی نوع ۱، مورد نیاز است. گیرنده‌ی نوع ۳ نیز به نوبه‌ی خود موجب افزایش فعالیت TGF- β می‌شود و گزارش شده است که مهار آنژیوتانسین گیرنده‌های TGF- β را تنظیم می‌کند و هر گونه اختلال در گیرنده‌ها و مهارکننده‌های این مسیرها به اختلال در رشد سلول منجر خواهد شد و مشخص شده است که آنژیوتانسین ۲، موجب متاستاز کبد با تولید TGF- β در سرطان کولورکتال می‌شود (۱۱-۱۲).

با توجه به این که تا کنون هیچ مطالعه‌ای بر روی اثر انالاپریل بر سرطان کولورکتال انجام نشده بود، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات ضد توموری انالاپریل و بررسی مسیرهای سلولی و مولکولی درگیر در سرطان کولورکتال بود.

اثرات سمیت سلولی مهارکننده‌ی انالاپریل بر سلول‌های سرطان کولورکتال از روش MTT استفاده شد. رده‌های سلولی سرطان کولورکتال شامل سلول‌های SW480، CT26 و HT-29 به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های مختلف انالاپریل قرار گرفتند و درصد زنده ماندن سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نتایج حاکی از عملکرد مهارتی وابسته به دز انالاپریل بر رشد سلول‌های سرطانی کولورکتال بود و مقادیر IC50 معادل ۲۳۰، ۲۰۸ و ۱۲۷ میکروگرم/میلی‌لیتر به ترتیب برای رده‌های سلولی CT26، SW480 و HT-29 به دست آمد.



شکل ۱. بررسی اثرات ضد تکثیری انالاپریل با استفاده از روش

MTT در سه رده‌ی سلولی CT26، SW480 و HT29

میزان IC50 در سه رده به ترتیب ۲۳۰، ۲۰۸ و ۱۲۷ به دست آمد.

بررسی مهاجرت سلولی: به منظور بررسی نقش مهارتی انالاپریل بر مهاجرت سلولی، سلول‌های رده‌ی SW480 و HT-29 تحت تیمار با انالاپریل با دز IC50 قرار گرفتند و در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و

بررسی چرخه‌ی سلولی توسط روش فلوسایتومتری: تعداد یک میلیون سلول در هر چاهک از پلیت شش خانه کشت داده شد و تحت تیمار با انالاپریل با دز IC50 به دست آمده از هر یک از رده‌های سلولی قرار گرفت. بعد از اتمام تیمار با دارو، سلول‌ها ترپسینه شدند و توسط بافر PBS شستشو انجام شد. در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها توسط اتانول به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تثبیت شدند. سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰g و شستشو با PBS انجام شد. انکوباسیون با آنزیم Ribonucleases (RNase) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و انکوباسیون با محلول Propidium iodide (PI) به مدت ۳۰ دقیقه و در نهایت، میزان فلورسانس نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری و اکاوی نتایج توسط نرم‌افزار FlowJo انجام شد (۳).

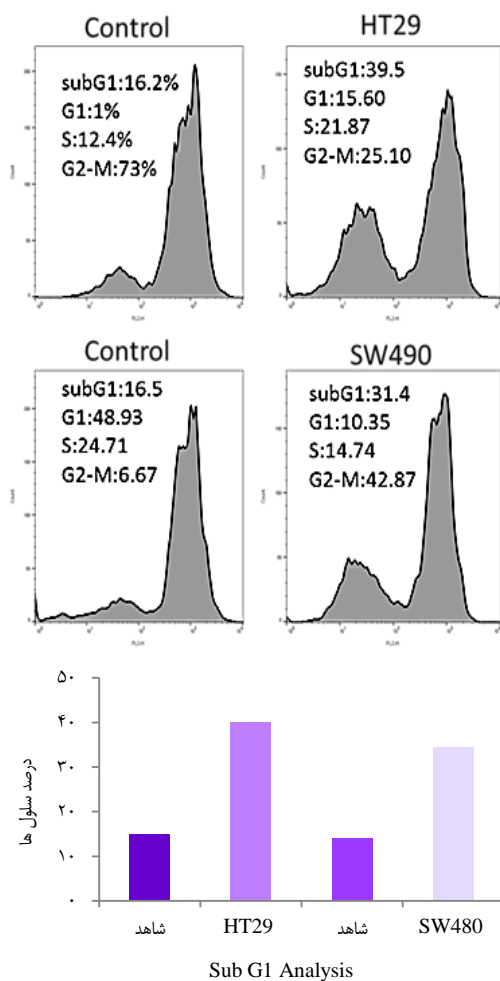
بررسی تغییرات سطح Messenger RNA (mRNA): برای بررسی بیان ژن‌های درگیر در سطح mRNA، ابتدا استخراج RNA انجام شد و غلظت آن با نانودراپ بررسی شد. سپس، سنتز complementary DNA (cDNA) صورت گرفت. طراحی پرایمر انجام شد و انجام واکنش Real time PCR و بررسی بیان ژن‌های ACE، VEGF-A، AT1R، TGF-β1 نتایج با استفاده از دستگاه Roche بررسی شد.

بررسی گونه‌های فعال اکسیژن سلولی (Reactive oxygen species یا ROS): به منظور بررسی نقش تحریکی انالاپریل در القای استرس اکسیداتیو سلولی از روش رنگ‌آمیزی با diacetate dichlorodihydrofluorescein (DCFDA) و تصویربرداری با میکروسکوپ فلورسنت استفاده شد. در این روش، ابتدا تعداد ۲۰،۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و تیمار با انالاپریل به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بعد از اتمام زمان تیمار، شستشو با PBS انجام و رنگ آمیزی توسط DCFDA با غلظت ۲۵ میکرومولار و حجم ۵۰ میکرولیتر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی انجام شد. در نهایت، شستشو با بافر PBS انجام و میزان جذب فلورسانس آن اندازه‌گیری شد. همچنین، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد (۳).
اکاوی آماری با استفاده از نرم‌افزار version 6 Graph Pad Prism و نسخه‌ی ۶ انجام شد. از آزمون t One-way ANOVA و Tukey's multiple comparison test جهت انجام روش‌های مقایسه‌ای استفاده شد. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید.

یافته‌ها

بررسی سمیت سلولی انالاپریل: در این مطالعه، به منظور بررسی

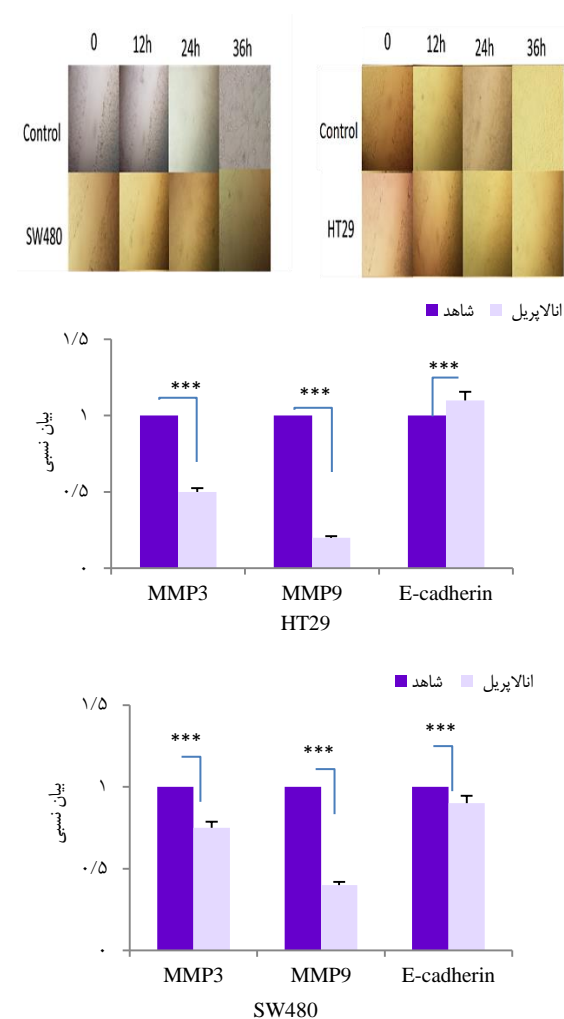
بررسی چرخه‌ی سلولی: در این مطالعه، عملکرد تنظیمی انالپریل بر چرخه‌ی سلولی رده‌های سلولی SW-480 و HT-29 توسط روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، رده‌های سلولی سرطان کولورکتال به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار انالپریل با غلظت برابر IC_{50} قرار گرفتند و نتایج در شکل ۳ نشان داد که انالپریل، باعث القای توقف در پیشرفت چرخه‌ی سلولی و القای مهار تکثیر سلولی در مرحله‌ی subG1 در این دو رده‌ی سلولی می‌شود.



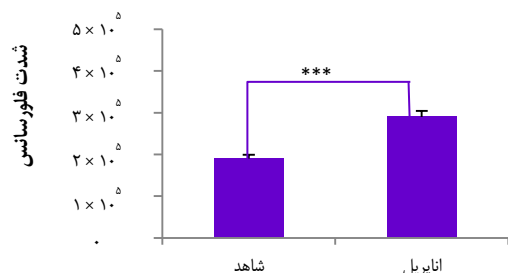
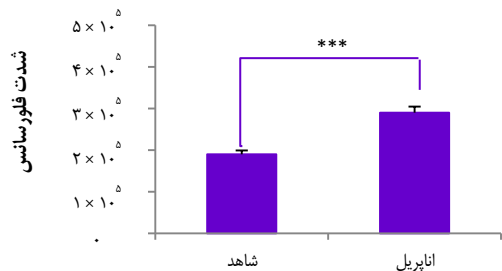
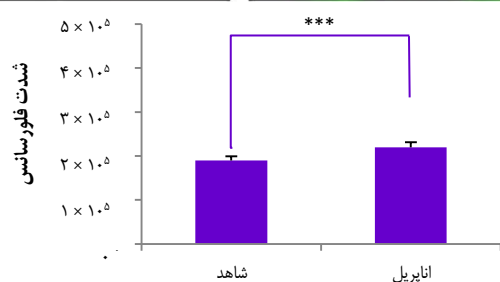
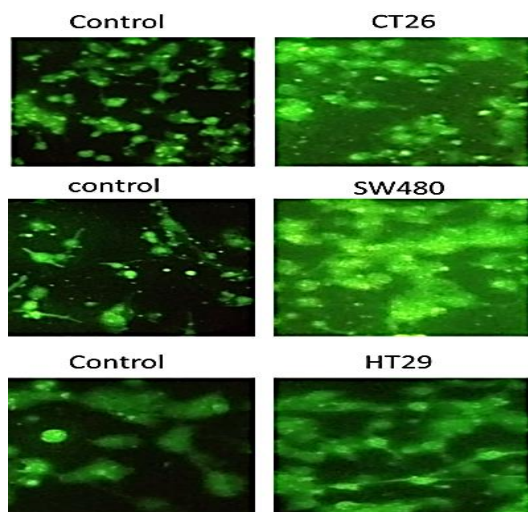
شکل ۳. بررسی چرخه‌ی سلولی با استفاده از فلوسایتومتری در دو رده‌ی سلولی SW480 و HT29 سرطان کولورکتال

بررسی نقش انالپریل بر بیان ژن‌های ACE، AT1R، VEGF- β و TGF- β در سرطان کولورکتال: بررسی بیان ژن‌ها در سلول‌های سرطان کولورکتال در شکل ۴ نشان داده شده است. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شده است. بیان ژن‌های ACE، AT1R، VEGF، TGF- β ، تفاوت معنی‌داری

۳۶ ساعت پس از تیمار، میزان مهاجرت سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، انالپریل مهاجرت سلول‌های سرطان کولورکتال را کاهش داد. به منظور تأیید عملکرد مهارتی انالپریل بر روند مهاجرت و متاستاز سلولی بیان ژن‌های دخیل در مهاجرت نظیر E-cadherin، MMP3 و MMP9 در سلول‌های تیمار شده‌ی سرطان کولورکتال مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، انالپریل باعث کاهش بیان ژن‌های متالوماتریکس پروتئیناز ۳ و ۹ و افزایش بیان پروتئین E-cadherin در سلول‌های سرطان کولورکتال شد ($P < 0.001$).

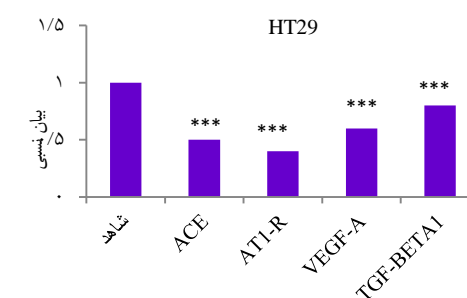
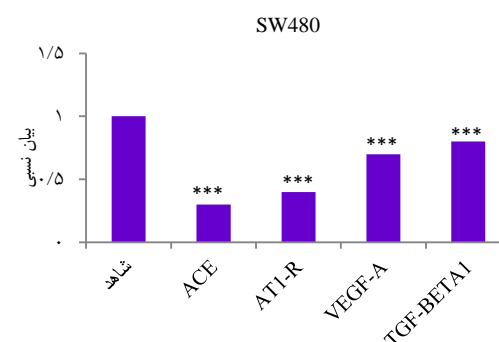
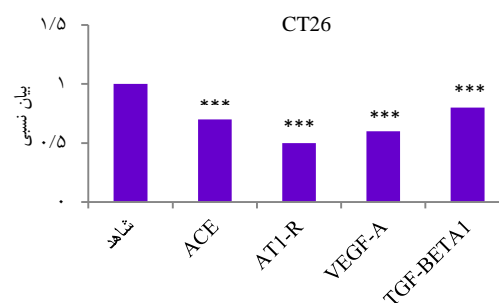


شکل ۲. بررسی اثر مهاجرت سلول‌ها در دو رده‌ی سرطان کولورکتال با استفاده از تکنیک Scratch assay و بررسی میزان بیان ژن‌های E-cadherin، Matrix metalloproteinase 3 (MMP3) و MMP9 در این دو رده‌ی سلولی با استفاده از تکنیک Real time polymerase chain reaction (Real time PCR)



شکل ۵. اثر انالاپریل بر گونه‌های فعال اکسیژن سلولی در سه رده سلولی سرطان کولورکتال (میزان شدت فلورسانس به ترتیب از بالا به پایین CT26، SW480 و HT-29)

بین گروه‌های شاهد و انالاپریل مورد مطالعه مشاهده شد ($P < 0/001$ برای همه‌ی موارد).



شکل ۴. بررسی میزان بیان ژن‌های **Angiotensin-converting enzyme (ACE)**، **Angiotensin II type I receptor (ATI-R)**، **Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)** و **Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)** در سه رده سلولی سرطان کولورکتال

بررسی سطح گونه‌های فعال اکسیژن سلولی: در این مطالعه، به منظور بررسی اثر انالاپریل بر تغییرات سطح گونه‌های فعال اکسیژن سلولی در سلول‌های سرطان کولورکتال، رده‌های سلولی SW480، CT26 و HT-29 مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، تیمار با انالاپریل باعث افزایش معنی‌دار در سطوح گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های رده‌ی SW480، CT26 و HT-29 شده است.

بحث

در این تحقیق، اثرات ضد تکثیر انالاپریل در سه رده سلولی SW480، CT26 و HT-29 بررسی شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر، در بررسی مهاجرت سلولی، فلوسایتومتری و همچنین، بیان ژن‌های درگیر نشان داد انالاپریل دارای پتانسیل ضد سرطانی در این رده‌های

آسیب بافت را کاهش می‌دهند، رگ‌زایی و رشد تومور را در سرطان ریه کاهش می‌دهند و طول عمر این بیماران را بهبود می‌بخشند (۲۵). در مطالعه‌ی دیگری، نشان داده شده است که مهار کننده‌های مسیر ACE/TGF- β و همچنین، مهار کننده‌ی گیرنده‌ی آنژیوتانسین ۲، با بهبود سرطان مثانه مرتبط بوده است (۲۶). Vinson و همکاران، اثرات مهار کننده‌ی ACE و AT1-R را که در آن کاهش سطوح آنژیوتانسین ۲ مشهود بود، در بهبود پیشرفت تومور نشان دادند (۲۷). بررسی انجام شده در این تحقیق نیز نشان داد انالاپریل در کاهش بیان AT1-R نقش دارد و همچنین، کاهش بیان معنی‌دار ACE نیز تأییدی بر این نتایج بود. تحقیقات دیگری اثر مهار کننده‌ی ACE را در درمان سرطان پوست نشان دادند. در این تحقیق، اثر مهار کننده‌های ACE، ARB و بتا بلاکرها بررسی شد و با توجه به نتایج ناهمگونی که به دست آمد، چنین نتیجه‌گیری شد که ارتباط مؤثری بین مصرف این مهار کننده‌ها و خطر بروز سرطان پوست وجود ندارد (۲۸). در مطالعه‌ی Menter و همکاران، تأثیر مهار کننده‌های سیستم آنژیوتانسین در بیماران مبتلا به سرطان ریه که شیمی درمانی می‌شدند، بررسی و نشان داده شد که افزایش این مهار کننده‌ها، با بهبود بقای بیماران همراه می‌باشد (۲۹). طبق مطالعه‌ی Smith و همکاران، به کار بردن مهار کننده‌های ACE از جمله انالاپریل، می‌تواند کاهش قابل توجهی در رشد سلول‌های سرطان سینه داشته باشد. آن‌ها نشان دادند که این مهار کننده‌ها، فعالیت خود را با کاهش سطوح ROS و آپوپتوز انجام می‌دهند (۳۰). مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که کاهش سطوح ROS همراه با افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن بود.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که انالاپریل، می‌تواند بر مهار رشد سلول‌های سرطان کولورکتال و مهاجرت مؤثر باشد. بنابراین، با توجه به ایمن بودن این دارو و اثرات مفید آن در جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی در سه رده‌ی سلولی کولورکتال، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در خصوص استفاده از داروهای مهار کننده‌ی مسیر رنین- آنژیوتانسین در درمان سرطان کولورکتال در کنار سایر درمان‌های استاندارد مورد مطالعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، برگرفته از پایان‌نامه‌ی دکتری تخصصی رشته‌ی زیست‌شناسی علوم جانوری تکوینی با شماره‌ی ۱۹۴۸۱ می‌باشد و از مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، مؤسسه‌ی ملی توسعه‌ی تحقیقات علوم پزشکی ایران (گرنه) شماره‌ی ۹۷۷۴۶۷ و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

سلولی می‌باشد. تأثیر مهار کننده‌های ACE در سلول‌های سرطانی و تومورها در بسیاری از مطالعات گزارش شده است؛ چرا که این تأثیر، با سیستم آنژیوتانسین در ارتباط است که به علت کاهش سطوح آنژیوتانسین ۲ و افزایش سطوح برادی‌کنین است (۱۳).

بررسی‌های مطالعه‌ی حاضر، اثرات ضد تکثیر انالاپریل را در سه رده‌ی سلولی نشان داد و نتایج بررسی‌های چرخه‌ی سلولی مهاجرت سلول‌ها در دو رده‌ی HT29 و SW480، بیان ژن‌ها و همچنین، بررسی تغییرات سطح اکسیژن فعال در هر سه رده، همگی حاکی از اثرات ضد توموری این مهار کننده‌ی مسیر ACE بود. Chen و همکاران، تأثیر مهار کننده‌های ACE نظیر انالاپریل را بر کاهش تکثیر سلولی در نروبلاستوما نشان دادند (۱۴). همچنین، گزارش شد که در رده‌ی سلولی HUVEC، کاهش آنژیوژنز توسط مهار کننده‌های ACE صورت گرفته است (۱۵). از آن جایی که عامل رشد اندوتلیال عروقی، یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر آنژیوژنز می‌باشد (۱۶)، بررسی‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی با استفاده از انالاپریل در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد. Fendrich و همکاران، تأثیر انالاپریل را در تأخیر پیشرفت سرطان پانکراس و اثرات درمانی آن گزارش دادند و نشان دادند که انالاپریل، به طور معنی‌داری اثرات ضد تکثیر دارد و باعث کاهش بیان ژن VEGF می‌شود (۱۷) که این کاهش بیان، با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همسو بود.

مطالعه‌ی دیگری، نقش ACE را در سرطان‌زایی نشان داد (۱۸). Neo و همکاران، نشان دادند در سرطان کولورکتال بیان AT1-R افزایش می‌یابد و این افزایش بیان با استفاده از مهار کننده‌ی ACE، کاپتوپریل، کاهش می‌یابد و منجر به کاهش حجم تومور می‌شود (۱۹). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد انالاپریل، علاوه بر این که بیان ژن VEGF را کاهش می‌دهد، بیان گیرنده‌ی آنژیوتانسین ۱ را نیز کاهش می‌دهد. تحقیقات نشان داده است اغلب اثرات مهارتی AT1-R از طریق VEGF میانجی‌گری می‌شود و از بین رفتن بیان AT1-R توسط انالاپریل گزارش شده است (۲۰) که در مطالعه‌ی حاضر نیز این اثر به خوبی مشهود بود و کاهش بیان این دو عامل مشاهده شد. همچنین، قسمت‌هایی از اثرات ضد توموری ممکن است به وسیله‌ی تومورهای مرتبط با ماکروفاژها کنترل شود (۲۱). گزارش شده است تنظیم پایین دست AT1-R با استفاده از انالاپریل با کاهش سطوح آنژیوتانسین ۲ همراه بوده است (۲۲).

در مطالعه‌ی دیگری، گزارش شد که مهار کننده‌های مسیر ACE/TGF- β ، تکثیر فیبروبلاست و بیان کلاژن را کاهش می‌دهند و این کار را از طریق فسفوریلاسیون Smad2,3 و TAK1 انجام می‌دهند (۲۳). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد بیان ژن TGF- β با استفاده از انالاپریل کاهش می‌یابد. از آن جایی که بین فرایند التهاب و آنژیوژنز ارتباط وجود دارد (۲۴)؛ Sun و همکاران نشان دادند مهار کننده‌های ACE، مسیرهای TGF- β و VEGF و سایر سیتوکاین‌ها که

References

1. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Ahmad SA, Jung YD, et al. New approaches to the treatment of hepatic malignancies angiogenesis and antiangiogenic therapy of colon cancer liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2003; 10(7): 722-33.
2. Neo JH, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C. Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(4): 577-84.
3. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(4): 271-89.
4. Wegman-Ostrosky T, Soto-Reyes E, Vidal-Millan S, Sanchez-Corona J. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16(2): 227-33.
5. Nakamura K, Yaguchi T, Ohmura G, Kobayashi A, Kawamura N, Iwata T, et al. Involvement of local renin-angiotensin system in immunosuppression of tumor microenvironment. *Cancer Sci* 2018; 109(1): 54-64.
6. Lindberg H, Nielsen D, Jensen BV, Eriksen J, Skovsgaard T. Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment? *Acta Oncol* 2004; 43(2): 142-52.
7. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004; 432(7015): 298-306.
8. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell* 1990; 63(2): 245-7.
9. Gomez RA, Tufro-McReddie A, Everett AD, Pentz ES. Ontogeny of renin and AT1 receptor in the rat. *Pediatr Nephrol* 1993; 7(5): 635-8.
10. Kang NS, Yim HE, Bae IS, Choi JH, Choi BM, Yoo KH, et al. ACE inhibition modulates transforming growth factor-beta receptors in the young rat. *Pediatr Nephrol* 2003; 18(9): 865-71.
11. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
12. Shimizu Y, Amano H, Ito Y, Betto T, Yamane S, Inoue T, et al. The role of angiotensin II in liver metastasis formation from colorectal cancer. *Kitasato Med J* 2017; 47: 43-51.
13. Volpert OV, Ward WF, Lingen MW, Chesler L, Solt DB, Johnson MD, et al. Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats. *J Clin Invest* 1996; 98(3): 671-9.
14. Chen L, Re RN, Prakash O, Mondal D. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 196(3): 280-3.
15. Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 2001; 7(4): 1073-8.
16. Salehi E, Amjadi FS, Khazaei M. Angiogenesis in health and disease: Role of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Isfahan Med Sch* 2011; 29(132): 312-26. [In Persian].
17. Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2010; 59(5): 630-7.
18. Erstad DJ, Cusack JC. Targeting the NF-kappaB pathway in cancer therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 2013; 22(4): 705-46.
19. Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer* 2010; 10: 134.
20. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25(4): 581-611.
21. Rhodes DR, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, et al. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(25): 10284-9.
22. Harrison-Bernard LM, El-Dahr SS, O'Leary DF, Navar LG. Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1999; 33(1 Pt 2): 340-6.
23. Fang QQ, Wang XF, Zhao WY, Ding SL, Shi BH, Xia Y, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor reduces scar formation by inhibiting both canonical and noncanonical TGF-beta1 pathways. *Sci Rep* 2018; 8(1): 3332.
24. Tahergerabi Z, Khazaei M. The relationship between inflammatory markers, angiogenesis, and obesity. *ARYA Atheroscler* 2013; 9(4): 247-53.
25. Sun F, Sun H, Zheng X, Yang G, Gong N, Zhou H, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors decrease the incidence of radiation-induced pneumonitis among lung cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer* 2018; 9(12): 2123-31.
26. Clark R, Wong K, Fan S, Chin J, Izawa J, Power N. Does the Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin II Receptor Blockers Improve Survival in Bladder Cancer? *EMJ Urol* 2018; 6(1): 90-7.
27. Vinson GP, Barker S, Puddefoot JR. The renin-angiotensin system in the breast and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19(1): R1-19.
28. Gandini S, Palli D, Spadola G, Bendinelli B, Coccorocchio E, Stanganelli I, et al. Anti-hypertensive drugs and skin cancer risk: A review of the literature and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 122: 1-9.
29. Menter AR, Carroll NM, Sakoda LC, Delate T, Hornbrook MC, Jain RK, et al. Effect of angiotensin system inhibitors on survival in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2017; 18(2): 189-97.
30. Smith TA, Phyu SM, Akabuogu EU. Effects of administered cardioprotective drugs on treatment response of breast cancer cells. *Anticancer Res* 2016; 36(1): 87-93.

Investigation of the Mechanism and Effect of Enalapril, Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor, on Proliferation, Apoptosis, and Migration in Colorectal Cancer Cells

Asma Mostafapour¹, Javad Baharara², Majid Khazaei³, Amir Avan⁴, Seyed Mahdi Hasanianmehr⁵

Original Article

Abstract

Background: Colorectal cancer is one of the most common cancers in Iran, and despite high cure rate, it still has high mortality. Some studies have shown that angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors are effective in treating cancer in addition to treating hypertension. The aim of this study was to investigate the effect of enalapril on the proliferation, migration, and expression of ACE, angiotensin II type I receptor (AT1R), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) genes in colorectal cancer cells.

Methods: In this study, the effect of enalapril on the survival rate of CT26, HT29, and SW480 colorectal cancer cells was determined using MTT assay, cell migration was assayed using migration assay technique, and cell cycle assay was performed using flow cytometry. Expression of matrix metalloproteinase 3 (MMP3), MMP9, and epithelial cadherin (E-cadherin), ACE, AT1R, VEGF-A, and TGF- β 1 genes were also evaluated using real-time polymerase chain reaction (PCR) technique and reactive oxygen species in these three cell lines.

Findings: Enalapril had anti-proliferative and anti-migrate effect on all three colorectal cancer cell lines compared to the control group. Expression of E-cadherin, MMP3, and MMP9 genes significantly decreased after treatment with enalapril ($P < 0.001$). Expression of ACE, AT1R, VEGF-A, and TGF- β 1 genes showed a significant decrease in the three cell lines, and the level of reactive oxygen species significantly increased in the three cell lines compared to the control group.

Conclusion: Given the various anticancer effects of enalapril, it seems that at least alongside standard chemotherapy drugs, enalapril may be useful in the treatment of colorectal cancer.

Keywords: ACE inhibitors; Enalapril; Colorectal cancer

Citation: Mostafapour A, Baharara J, Khazaei M, Avan A, Hasanianmehr SM. Investigation of the Mechanism and Effect of Enalapril, Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor, on Proliferation, Apoptosis, and Migration in Colorectal Cancer Cells. J Isfahan Med Sch 2020; 38(581): 442-9.

1- PhD Student, Department of Biology, School of Sciences, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Biology AND Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
3- Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4- Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5- Assistant Professor, Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Corresponding Author: Majid Khazaei, Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran; Email: khazaeim@mums.ac.ir