ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of inhibitory effect of melatonin on gastric adenocarcinoma AGS and MKN45 cell lines

Mohammad Shokrzadeh[1],
Ramin Ataee[2,3],
Atefeh Asemi[3]

[1] Asociate Professor, Department of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Thalassemia Research Center and Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 14, 2013 ; Accepted September 4, 2013)

Abstract

Background and purpose: Melatonin is a neurohormone with important physiologic and pharmacologic role in human body especially in circadian rhythm .In recent years, some progress has been achieved to show its role in regulating in prevention of cancer especially breast and colon cancer. According to this background and as there was not any precise cellular research about the role of melatonin in gastric cancer in which this study this study has been aimed.

Materials and methods: In this study, we used MTT assay procedure. Also, we have provided AGS and MKN-45 cell line from national cell bank, Institute Pasteur of Iran. The cells were cultured in RPMI medium in 5% CO2, 37^0C in 96 wells culture plate and then were incubated with melatonin and cisplatin (as positive control) for 48 hr. in 5 different concentrations. The proliferation index as cell viability was achieved and compared with controls groups with ELISA concerning Formazan crystal color absorbance between 450-690 nm.

Results: Our results showed that melatonin in 12.5-200 µM has significant anti-proliferative effects in AGS cells and in 50-200 µM in MKN-45 compared with control and these results were in parallel with the effects of cisplatin.

Conclusion: According to our data, we have shown that melatonin in a dose -dependent manner has antiproliferative effect in gastric adenocarcinoma cells and this effect in AGS cells was more potent than MKN-45 but more studies are needed to find the kind of receptors and the interacellular signaling pathways.

Keywords: Melatonin, gastric adenocarcinoma, Proliferation, MTT assay, Cisplatin

J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(107): 96-105 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۰۷ آذر سال ۱۳۹۲ (۱۰۵-۹۷)

بررسی اثر مهاری ملاتونین بر رده های سلولی AGS و MKN45 آدنوکارسینوما معده

محمد شکرزاده[۱]
رامین عطایی[۲و۳]
عاطفه عاصمی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: ملاتونین به عنوان یک نوروهورمون بوده که خواص مهمی در بدن داراست .در سال‌های اخیر اهمیت ملاتونین در پیش‌گیری از سرطان مورد توجه قرار گرفته و در برخی مطالعات آثار آنتی‌پرولیفراتیو و آپوپتوتیک آن در برخی کانسرها از جمله کانسر پستان و کولون مشخص شده است. هم‌چنین با توجه سطح بالای این هورمون در سیستم گوارشی احتمال نقش حفاظتی فیزیولوژیک و فارماکولوژیک آن در این سیستم در نظر گرفته شده با توجه با این اطلاعات و سوابق و با در نظر گرفتن این موضوع که تاکنون مطالعات دقیقی در رابطه با نقش ملاتونین در آدنوکارسینوما معده انجام نشده و یا تنها برخی مطالعات محدود در این رابطه موجود است این مطالعه برای اولین بار در سطح رده‌های سلولی AGS و MKN45 طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: برای بررسی اثرات آنتی پرولیفراتیک ملاتونین از روش MTT Assay استفاده شد. همچنین برای بررسی سلولی از سلول‌های آدنوکارسینوما معده AGS و MKN ۴۵- استفاده شد که پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته با غلظت‌های مختلف ملاتونین در دمای ۳۷ درجه و CO2 پنج درصد میزان پرولیفراسیون با کنترل منفی مقایسه شد و هم‌چنین برای کنترل مثبت از داروی Cisplatin استفاده شد.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که ملاتونین در سلول‌های AGS در غلظت ۱۲/۵ تا ۲۰۰ میکرومولار و در سلول‌های MKN از غلظت ۵۰-۲۰۰ میکرومولار به‌طور معنی‌دار باعث کاهش Cell viability گردیده است و هم‌چنین IC50 ملاتونین هم در سلول‌های AGS و هم MKN نسبت به کنترل معنی‌دار بود این کاهش در مقایسه با سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت قابل ملاحظه است.

استنتاج: بر اساس نتایج به‌دست آمده مشخص شده که ملاتونین می‌تواند در یک شیوه وابسته به دوز باعث کاهش Cell Viability در سلول‌های آدنوکارسینوما معده گردد که این موضوع با مطالعات در کانسر پستان و کولون هم‌خوانی دارد و می‌توان ملاتونین را به عنوان یک عامل فیزیولوژیک و فارماکولوژیک در کنترل رشد سلول‌های معدی معرفی کرد.

واژه های کلیدی: سرطان معده، ملاتونین، پرولیفراسیون، MTT Assay

مقدمه

امروزه سرطان از مهم‌ترین مشکلات پیش روی علوم پزشکی می‌باشد و تعداد قربانیان و مبتلایان به این بیماری به صورت روزافزونی در حال گسترش است. سرطان یک بیماری نئوپلاستیک است که در اثر اختلال در روند

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۷- ۹۱ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: رامین عطایی- کیلومتر ۱۸ جاده خزر آباد، مجتمع علوم پزشکی پیامبراعظم(ص)، دانشکده داروسازی E-mail: ramin_ataee@yahoo.com
۱. دانشیار، گروه داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات تالاسمی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۲/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۲/۵/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۲/۶/۱۳

چرخه سلولی رخ می‌دهد. در بروز سرطان، اختلال در روند کنترل تکثیر سلولی منجر به ازدیاد لجام گسیخته سلول‌ها و ایجاد بافت سرطانی و تومور می‌شود که در بعضی موارد با متاستاز به بافت‌های مختلف موجب درگیری ارگان‌های گوناگون می‌گردد(۲،۱).

تحقیقات نشان داده‌اند که رژیم‌های غذایی مهم‌ترین عامل در ابتلا به سرطان معده هستند و در کشورهایی که استفاده از گوشت قرمز بیش‌تر است ابتلا به سرطان معده نیز بیش‌تر است(۶-۳). خطر ابتلا به سرطان در افراد طبقات اجتماعی اقتصادی پایین، بیش‌تر است. از میان عوامل مختلف، عادات غذایی و عفونت با هلیکوباکترپیلوری بیش از همه بیش‌تر مورد توجه قرار دارند(۸-۶). هم‌چنین غلظت بالای نمک در معده مایع مخاطی را از بین می‌برد و منجر به التهاب و آسیب از جمله فرسایش و انحطاط مخاط معده می‌شود. بنابراین از نظر بیولوژیکی محتمل است که مصرف بیش از حد نمک خطر ابتلا به سرطان معده را در انسان افزایش می‌دهد.

آدنوکارسینوم‌ها ۹۵ درصد کانسرهای معده را تشکیل می‌دهند و کارسینوما سلول‌های سنگ‌فرشی Squamus cell carcinoma، تومورهای کارسینوئید Carcioid tumors، لیومیوسارکوم ها (Liomasarcoma) و لنفوم‌ها بقیه این کانسرها را تشکیل می‌دهند(۸). در کشورهای غربی، رایج‌ترین رژیم‌های شیمی درمانی استفاده از سیس پلاتین به عنوان یک ترکیب آلکیله کننده و انفوزیون ۵ - فلوئورواوراسیل (FU-۵) به عنوان یک مهار کننده تیمیدیلات سنتتاز (رژیم سیس پلاتین، FU-۵ [CF]) و یا CF همراه با اتوپوزاید، Etoposide (رژیم ECF) می‌باشد(۹). برای اولین بار ملاتونین (ان-استیل- ۵- متوکسی تریپتامین) در سال ۱۹۸۷ توسط Learner و همکارانش شناسایی و جداسازی شد(۱۰). ملاتونین نقش مهمی در سیستم ساعت بیولوژیک داشته و هم‌چنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی قوی می‌باشد. میزان ملاتونین در نیمه شب به بالاترین مقدار و در طول روز به کم‌ترین مقدار ممکن می‌رسد(۱۱). هم‌چنین مطالعات جدید نقش آنتی‌کانسری برای ملاتونین به دلیل خواص آنتی اکسیدانتی و محافظت سلولی و انکوستاتیک پیشنهاد نموده است. به طوری‌که نشان داده شده است که ملاتونین باعث تخفیف علایم بسیاری از کانسرها و مهار آنژیوژنزیس، پرولیفراسیون و متاستازیس می‌گردد(۱۳،۱۲).

تاکنون سه رسپتور (MT1,MT2,MT3) شناسایی شده اند. MT1 انسانی و MT2 از رسپتورهای ملاتونینی کلون شده‌اند و هر دو شان از گیرنده‌های متصل شونده به خانواده G پروتئین‌ها (GPCRs) هستند. با وجودی‌که بسیاری از رسپتورهای MT1 وMT2 به طور عمومی به ترتیب در مغز و شبکیه بیان می‌شوند. آن‌ها هم‌چنین به طور گسترده در تعدادی از دیگر بافت‌ها شامل فولیکول‌های تخمدان، پروستات، سلول‌های سیستم ایمنی و کلیه گسترش یافته‌اند(۱۵،۱۴). براساس مطالعات مختلف مشخص شده که ملاتونین دارای خاصیت انکوستاتیک برروی کانسر به خصوص کانسرهای وابسته به هورمون است(۱۵). برخی مطالعات نشان می‌دهد که فعال شدن غده پینه آل یا افزایش جذب ملاتونین باعث کاهش رشد سرعت تومورهای پستانداران می‌گردد. در حالی‌که Pinealectomy با کاهش تولید ملاتونین باعث تحریک تومور در پستانداران گردیده است. مشخص شده که ملاتونین باعث کاهش انسدانس کانسر پستان با Downregulation سنتز برخی هورمون‌ها که برای رشد نرمال و پاتولوژیکال غدد پستان لازم است می‌گردند(۱۸-۱۶). هم‌چنین ملاتونین می‌تواند اثرات مستقیم بر سلول‌های توموری داشته باشد(۲۳-۱۹). برخی یافته‌ها از مطالعات محققان در مدل‌های حیوانی و یا رده‌های سلولی Breast cancer دلالت براین موضوع است که آثار آنتی‌کانسری ملاتونین بر تومورهای وابسته به هورمون عمدتاً وابسته به کارایی شان از طریق مسیرهای Signalling استروژنیک است(۲۳).

عمدتاً آثار ملاتونین بر سلول‌های کانسری نه تنها به وسیله مکانیسم‌های وابسته به اتصالشان به رسپتور به اثبات رسیده (در غشا یا هسته)، بلکه از طریق غیر وابسته به رسپتور از طریق اتصال به کالمودولین و یا آثار آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند این آثار را اعمال کند(۲۵،۲۴). در سلول‌های کانسر پستانداران ژن‌های آروماتاز حاوی پروموتورهای کنترل شده به وسیله cAMP می‌باشند(۲۸-۲۶) و برخی از عوامل هم‌چون ملاتونین که باعث کاهش cAMP گردد می‌تواند باعث کاهش فعالیت آروماتاز گردد. هم‌چنین افزایش بیان رسپتور MT1 باعث تقویت آثار مهار رشد ملاتونین در سلول‌های کانسر پستان (MCF-7) که از لحاظ بیان استروژن مثبت بوده اند گردیده است(۲۹). شواهدی در رابطه با فعالیت ملاتونین در غشاء GI به وسیله Rahimimoff Questel نشان داده شده است. به طوری‌که آن‌ها ثابت کرده‌اند که ملاتونین می‌تواند باعث کاهش انقباض خوبخود روده‌ها گردد(۳۰،۲۹). اخیراً مشخص شده است که ملاتونین نه تنها در غشاء GI وجود دارد بلکه برخی یافته‌ها دلالت بر این موضوع دارند که این ماده به طور موضعی به وسیله دو آنزیم AANAT و HIOMT تولید می‌شود که این آنزیم‌ها در غشاء اپیتلیال رودی بیان می‌شوند. هم‌چنین نشان داده شده است که غلظت ملاتونین در روده ۱۰-۱۰۰ بار بیش‌تر از سرم است(۳۰،۲۹). ملاتونین هم‌چنین می‌تواند تحریک ترشح بی‌کربنات موکوسی را با تحریک رهاسازی کلسیم در سلول‌های انتروکرومافین رودی را سبب شود که این اثر به نظر می‌رسد به‌وسیله رسپتور MT2 وساطت می‌شود(۳۲،۳۱).

هم‌چنین نشان داده شده است که ملاتونین باعث فعال‌سازی ترشح پانکراتیت آمیلاز و Cholecyctokinin از طریق فعال‌سازی MT2 رسپتور گردد. هم‌چنین ملاتونین می‌تواند یک‌سری آثار غیر وابسته به رسپتور در غشاء GI همچون جمع‌آوری رادیکال، آزاد داشته باشد(۳۳).

اخیراً نقش پیشگیری‌کننده ملاتونین بر علیه تشکیل اولسر و درمان آن به خوبی شناخته شده است(۳۴). با توجه به شناسایی محل‌های اتصال ملاتونین در بیماران دچار کارسینوم کلون و رکتوم امکان نقش ملاتونین در کانسر کولورکتال با توجه به مطالعات مختلف مشخص شد(۳۵). هم‌چنین مشخص شده که مکانیسم کنترلی ملاتونین در کولون شامل مهار آنژیوژنز تومور، تنظیم فعالیت میتوزی وآپوپتوتیک و تنظیم سلولی غلظت گلوتاتیون است(۴۱،۳۵). دیگر پیشنهادات برای تأثیرات ملاتونین در ارتباط با تنظیم رسپتورهای استروژن می‌باشد. همچنین آثار مستقیم بر سیکل سلولی، تأثیر بر روی فاکتورهای رشد مختلف سلولی و افزایش فاصله اتصالات سلولی (Gap-junction) و افزایش آنتی‌اکسیدانت‌های داخل سلولی می‌تواند برای مکانیسم آن در نظر گرفته شود(۴۳،۴۲). برخی محققین تأکید دارند که در کولون آدنوکارسینوما، رسپتورهای غشایی و هسته‌ای ملاتونین در خواص انکوستاتیک آن‌ها نقش دارند(۴۵،۴۴). هم‌چنین ملاتونین می‌تواند فعالیت ایمنی را با اتصال به رسپتورهایش برروی سلول‌های T-helper و مونوسیت‌ها و تحریک تولید INFγ و اینترلوکین ۱ و ۲ و ۶ و و ۱۲ تنظیم کند(۴۶). ملاتونین از این طریق هم‌چنین می تواند بیان $NF_{K\beta}$، TNF-α، IL-1β و STAT3 را کنترل کند. ملاتونین هم‌چنین از طریق دیگر می‌تواند سیستم لنفوسیت و مونوسیت/ ماکروفاژ را فعال کرده که از این طریق می‌تواند به عنوان یک عامل Immunosurveillant برای پیشگیری از پیشرفت تومور عمل کند(۴۷).

در مطالعات بالینی نشان داده شده که ملاتونین می‌تواند آثار Cytoprotective (حفاظت سلولی) داشته و باعث افزایش کارایی شیمی درمانی کانسر و افزایش امید به زندگی می‌گردد(۴۷).

هم‌چنین براساس بسیاری از مطالعات اضافه کردن ملاتونین به رژیم شیمی درمانی می‌تواند باعث کاهش سمیت شیمی درمانی و رادیوتراپی در بیماران دچار کلورکتال کارسینوما شود(۴۶،۴۷).

Zhang در مطالعه‌ای اخیر نشان داد که ملاتونین می‌تواند باعث مهار مهاجرت سلولی و تحریک آپوپتوزیس

در رده سلولی SGC7901 کانسر معده گردد(۴۷). با توجه به نقش ملاتونین در دستگاه گوارش و آثار مهمش در پیشگیری ودرمان کانسر کلورکتال اما مطالعه دقیقی در رابطه با نقش ملاتونین در کانسر معده صورت نگرفته و یا مطالعات بسیار محدود است و بنابراین برآن شدیم که نقش این نوروهورمون را در کانسر معده در مدل سلولی AGS و MKN45 بررسی و اثر ملاتونین را در پرولیفراسیون این رده‌های سلولی مطالعه کنیم.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش به شرح ذیل می‌باشد:

محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با L-گلوتامین، آنتی بیوتیک مخصوص کشت سلولی (پنیسیلین/ استرپتومایسین) و سرم جنین گاوی (FBS) از شرکت PAA Laboratories Gmb(Pasching,Austia) خریداری شدند. نمک MTT (3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) نیز از شرکت Sigma-Aldrich (st.louis,Missouri,USA) خریداری شد. رده سلولی سرطان معده انسانی (AGS و MKN-45) از انستیتو پاستور (تهران- ایران) تهیه شد.

نگهداری و کشت سلولی

رده سلولی سرطان معده انسانی AGS و MKN-45 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین- استرپتومایسین) در CO2 انکوباتور (BINDER,USA) تحت شرایط ۳۷ C° و ۵ درصد دی اکسید کربن کشت داده شد برای انجام تست MTT از سلول‌هایی که در فاز رشد لگاریتمی در فلاسک‌های کشت به تقریباً ۷۰-۶۰ درصد رشد سلولی زسیدند، استفاده شد.از آن‌جایی که رده سلولی AGS چسبنده به کف می‌باشد، برای جداسازی سلول‌ها از فلاسک یا پلیت از محلول رقیق شده تریپسین- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و متعاقب آن سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی در ۲۵۰۰rpm برای ۵ دقیقه استفاده شد. برای بررسی زنده بودن سلول‌ها و هم‌چنین شمارش سلولی، پس از اطمینان از عدم وجود آلودگی، روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و لام هموسایتومتر (نئوبار)به کار گرفته شد.

بررسی میزان سمیت سلولی با روش MTT Assay

برای بررسی اثرات آنتی پرولیفراتیک ملاتونین از روش MTT Assay استفاده شد. این روش بر اساس تبدیل نمک تترازولیوم به کریستال‌های رنگی فورمازان توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و مقایسه میزان رنگ تولید شده در نمونه‌های مختلف به کمک اندازه‌گیری جذب نوری آن‌ها می‌باشد(۱۹). در این روش بعد از شمارش سلولی، 10^4 سلول در ۹۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی در هر خانه از پلیت ۹۶خانه کاشته شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون میزان و غلظت مناسب از نمونه‌ها (ملاتونین و سیس پلاتین) برای رسیدن به غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکرومول در میلی‌لیتر به هر خانه اضافه وآزمایش برای هر غلظت ۳ بار تکرار شد. به خانه‌های کنترل محیط کشت کامل و فاقد ماده دارویی افزوده شد. سپس هر پلیت ۴۸ ساعت انکوبه شد و بعد از اتمام زمان مورد نظر،۱۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT تازه آماده شده به هر خانه افزوده شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون مجدد، محیط کشت هر خانه به آرامی خارج شد و میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر خانه افزوده شده و ۱۵دقیقه به آرامی در دمای اتاق حرکت داده شد. سپس جذب خانه توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ در برابر ۶۹۰ نانومتر قرائت شد. دراین آزمایش کنترل مثبت سلول‌هایی بوده اند که با سیس پلاتین مواجه شده بودند و کنترل منفی سلول‌هایی که با هیچ دارویی تماس نداشته‌اند. نتایج حاصل از

طریق فرمول ذیل به میزان بقای سلولی تبدیل شد:

$$\text{میزان بقای سلولی}(Cell\ viability\%) = \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل}} \times 100$$

لازم به توضیح است که رنگ MTT به سلول‌های زنده جذب می‌شوند. پس از جمع‌آوری داده‌های حاصل از ۳ بار تکرار؛ و IC50 (میزان غلظتی که سبب مهار رشد تا میزان ۵۰ درصد می‌شود) با استفاده از نرم‌افزار SPSS, version 20 محاسبه و گزارش شد. نحوه محاسبه IC50 با استفاده از رسم نمودار Dose response و ترسیم خط رگراسیون و تعیین میزان غلظت مهار ۵۰ درصد از روی تعیین نقطه تلاقی محور x و y نمودار نیز قابل محاسبه است.

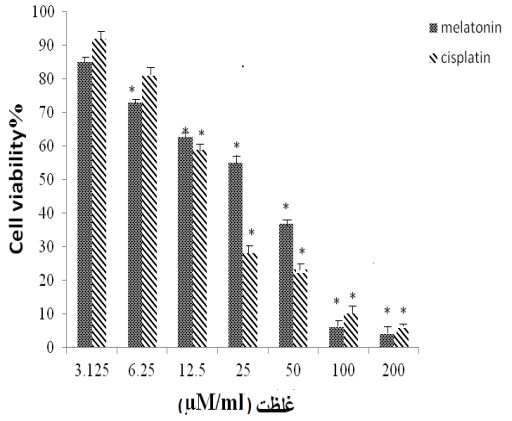
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

براساس میانگین ± انحراف معیار از نرم‌افزار آماری (SPSS, version 20) و جهت بررسی میانگین داده‌ها بین گروه‌های تست و کنترل از تست آماری ANOVA یک طرفه و Tukey Post test استفاده شد ($p < ۰/۰۵$).

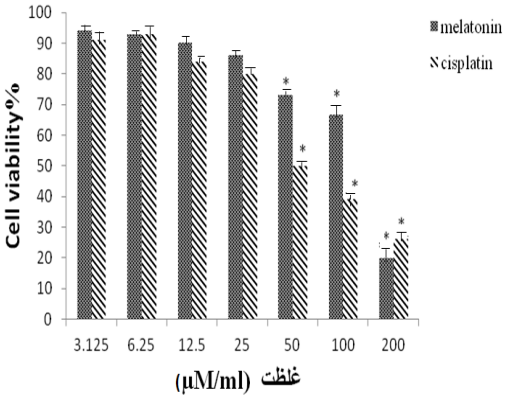
یافته ها

در مقایسه پرولیفراسیون سلولی حاصل از مواجهه رده‌های سلولی AGS و MKN-45 با داروی ملاتونین و سیس پلاتین در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت و با غلظت‌های مختلف مشخص شد که ملاتونین در سلول‌های AGS در غلظت ۱۲/۵ تا ۲۰۰ میکرومولار و در سلول‌های MKN از غلظت ۵۰- ۲۰۰ میکرومولار به‌طور معنی‌دار باعث کاهش Cell viability (میزان بقای سلولی) گردیده است (نمودارهای شماره ۱ و ۲).

میزان Cell viability همان‌طور که روش کار توضیح داده شد بر اساس جذب رنگی کریستال‌های Formazen توسط سلول‌های زنده و قرائت جذب توسط دستگاه Eliza reader در ۵۹۰nm و معادله مربوطه می‌باشد و هم‌چنین IC50 ملاتونین هم در سلول‌های AGS و هم MKN نسبت به کنترل معنی‌دار بود (جدول شماره ۱ و نمودارهای شماره ۳ و ۴).



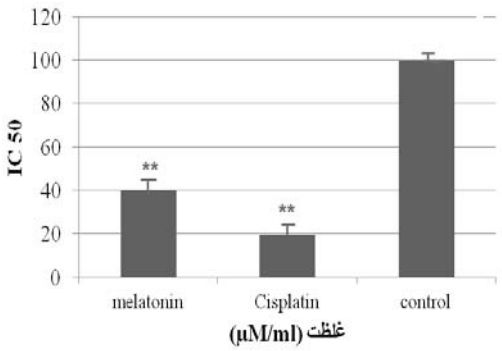
نمودار شماره ۱: درصد بقای سلولی رده AGS در مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی ملاتونین و سیس پلاتین طی زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، *: P<0.05 significant



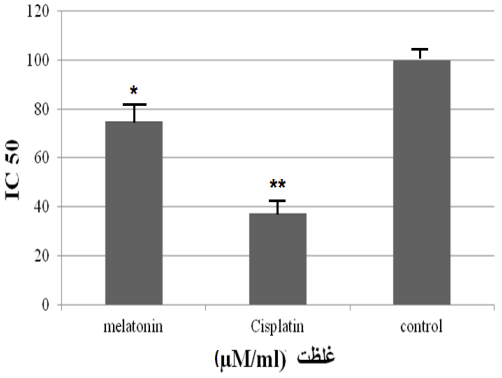
نمودار شماره ۲: درصد بقای سلولی رده MKN-45 در مواجهه با غلظت‌های مختلف از داروی ملاتونین و سیس پلاتین طی زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، *: p<۰/۰۵ significant

جدول شماره ۱: مقادیر میانگین IC50 ± انحراف معیار داروی ملاتونین و سیس پلاتین در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، بر روی رده سلولی AGS و MKN

میانگین ± انحرافمعیار / IC50(µg/ml) رده سلولی	ملاتونین	سیس پلاتین	سطح معنی داری
AGS	۴۰/۳۳±۰/۰۳۶	۱۹/۱۲±۰/۱۳	<۰/۰۵
MKN-45	۷۵/۴۹±۰/۰۱۳	۳۷/۲۳±۰/۰۴	<۰/۰۵



نمودار شماره ۳: مقایسه مقادیر میانگین IC50 ± انحراف معیار داروی ملاتونین و سیس پلاتین در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، بر روی رده سلولی AGS *P<0.05significant: ** p<۰/۰۰۵ significant:



نمودار شماره ۴: مقایسه مقادیر میانگین IC50 ± انحراف معیار داروی ملاتونین و سیس پلاتین در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت، بر روی رده سلولی MKN-45 *P<0.05significant: **P<0.005 significant:

این کاهش در مقایسه با سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت قابل ملاحظه است وبا محاسبه مقادیر IC50، مشخص شد که اگرچه میزان IC50 داروی ملاتونین از سیس پلاتین در هر دو رده سلولی بیش‌تر است اما در سلول‌هایی AGS در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و در سلول‌های MKN در غلظت ۲۰۰ میکرومولار ملاتونین حتی بیش‌تر از سیس پلاتین باعث کاهش بقای سلولی گردیده است (نمودارهای شماره ۱و۲).

بحث

بر اساس نتاج به دست آمده از تحقیق اخیر مشخص شده که ملاتونین می‌تواند در یک روش شیوه وابسته به دوز باعث کاهش Cell Viability در سلول‌های آدنوکارسینوما معده (AGS) گردد که این اثر قابل مقایسه با cisplatin می‌باشد (نمودارهای شماره ۱ و ۴). که این موضوع با مطالعات در کانسر پستان و کولون هم‌خوانی دارد(۱۶،۱۹،۲۱،۴۷). لازم به توضیح است که Cisplatin به عنوان یک داروی آلکیله کننده مطرح بوده که در بسیاری از تومورهای گوارشی از طریق آلکیله کردن DNA هسته‌ای اثر ضد کانسری دارد(۶) و در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است. هم‌چنین این اثرات ملاتونین بر روی سلول MKN نیز معنی‌دار است اما IC50 ملاتونین بر روی سلول AGS کم‌تر از MKN می‌باشد (جدول شماره ۱ نمودار شماره ۴) که نشان می‌دهد سلول‌های AGS جهت اثر ملاتونین مؤثرترند که بر می‌گردد به این موضوع که احتمالاً میزان رسپتورهای ملاتونینی در این سلول ها بیش‌تر است.

در کانسر پستان مشخص شده که ملاتونین از طریق MT1 باعث کاهش فعالیت آروماتاز و هم‌چنین کاهش بیان رسپتورهای استروژنی می‌تواند نقش مهاری داشته باشد و در کانسر کولون مشخص شده که ملاتونین می‌تواند از طریق رسپتور MT2 باعث ترشح بی‌کربنات و موکوس با تحریک رهاسازی کلسیم در سلول‌های انتروکرومافین معده گردد(۱۶،۲۱،۲۳،۴۶). با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای در مورد نقش رسپتورهای ملاتونینی در کانسر معده انجام نشده بنابراین این احتمال وجود دارد که ملاتونین اثر خود را ازطریق رسپتورهای MT1 و MT2 اعمال نماید.

با توجه به این‌که رسپتورهای MT1 و MT رسپتورهای سطحی از نوع GPCRs می‌باشند این احتمال وجود دارد که تحریک ملاتونین باعث تحریک کینازهای داخل سلولی و برخی فسفریلاسیون‌هایی که با مهار یک‌سری ترانسکریپشن فاکتورهای هسته‌ای همراه است اعمال گردد که این نقش می‌تواند با اثر سروتونین در سطح سلولی در القا MAPKinase و افزایش آثار میتوژنیک متفاوت باشد(۲۱-۱۹). و با برخی مطالعات که

افزایش سطح ملاتونین با کاهش آثار سروتونین در GI همراه است، مطابق باشد.

براساس مطالعه حاضر می‌توان نقش ملاتونین را به عنوان یک عامل انکوستاتیک در کانسر معده با مکانیسم سلولی نشان داد و برای مشخص شدن بیش‌تر نقش رسپتورهای ملاتونینی در کانسر معده نیاز است که در مطالعات آینده از آنتاگونسیت‌های اختصاصی رسپتورهای ملاتونینی در سطح سلولی و مطالعات آپوپتوزیس در سطح سلولی و مولکولی در آدنوکارسینوما معده و مدل in vivo در موش Nude جهت بررسی اثر ملاتونین در روند رشد تومور در حیوان بهره جست.

سپاسگزاری

از زحمات جناب دکتر یزدانی و همکارانشان که در آنالیز آماری داده‌ها مساعدت ممکن را مبذول داشته و هم‌چنین خانم علیزاده از آزمایشگاه سم شناسی و داروشناسی دانشکده داروسازی علوم پزشکی مازندران که در انجام مراحل عملی کمال همکاری را داشته‌اند صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

References

1. Guéritte-Voegelein F, Guénard D, Lavelle F, Le Goff MT, Mangatal L, Potier P. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. J Med Chem 1991; 34(3): 992-998.
2. Sinibaldi VJ, Carducci MA, Moore-Cooper S, Laufer M, Zahurak M, Eisenberger MA. Phase II evaluation of docetaxel plus one-day oral estramustine phosphate in the treatment of patients with androgen independent prostate carcinoma. Cancer 2002; 94(5): 1457-1465.
3. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2005; 55(1): 10-30.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61(2): 69-90.
5. Berrington de Gonzalez A, Curtis RE, Kry SF, Gilbert E, Lamart S, Berg CD, et al. Second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEER cancer registries. Lancet Oncol 2011; 12(4): 353-360.
6. Biglarian A, Hajizadeh A, Gohari M, Khodabakhshi R. Survival Analysis of Patients with Gastric Adenocarcinomas and Factors related. Kosar Medical Journal 2007; 12(4): 345-355.
7. Ramzani B, Hanifi A.konwledge of geographical incidence distribution of gastric cancer in Gilan province. Biologic Environmental Sciences and Technology 2011; 49(2): 81-93.
8. Roshanaii G, Kazemnejad A, Sedighi S. Estimation of survival of patients with gastric adenocarcinoma taken surgery at Institute cancer of Imam hospital and effective agents. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2010; 17(3): 13-18.
9. Di Bella G, Mascia F, Gualano F, Di Bella L. Melatonin Anticancer Effects: Review. Int J Mol Sci 2013; 14(2): 2411-2416.
10. Anisimov V. The role of pineal gland in breast cancer development. Crit Rev Oncol Heat 2003; 46(3): 224-226.
11. Gahromi Soyuf M, Gaini M, Choobineh A, Rahimi S, Mazraeh M, Nazari S. Evaluation of melatonin usage on cardio-respiratory scales during exercise activities. J Army Univ Med Sci I.R. Iran 2011; 9(1): 6-11.
12. Ajani JA. The role of docetaxel in gastric

cancer. Eur J Cancer.Supplements 2006; 4(2): 4-9.

13. Slominski R, Reiter R, Schlabritz-Loutsevitch N, OstromA R , Slominski A. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. Mol Cell Endocrinol 2012; 351(2): 152-166.
14. Mehraiin F, Negahdar F. Morphological changes in acriminal glands and ocular epithelial after melatonin administration in withe Mice. J Iran Anat Sci 2011; 9(34): 57-62.
15. Pandi-Perumal S, Trakht I, Srinivasan V, Warren Spence D, Maestroni G, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. Prog Neurobiol 2008; 85(3): 335-353.
16. Witt-Enderby P, Bennett J, Jarzynka M, Firestine M, Melan M. Melatonin receptors, and their regulation: biochemical and structural mechanisms. Life Sci 2003; 72(20): 2183-2198.
17. Gonzalez A, Martinez C, Mediavilla MD. Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effect of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. Oncol Rep 2007; 17(4): 947-953.
18. Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin and mammary pathological growth. Front Neuroendocrinol 2000; 21(2): 133-170.
19. Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. Histol Histopathol 2000; 15(2): 637-647.
20. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadianbased cancer therapy. Curr Top Med Chem 2002; 2(2): 113-132.
21. Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R. Melatonin and mammary cancer: a short review. Endocr Relat Cancer 2003; 10(2): 153-159.
22. Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Mediavilla MD, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C. Melatonin-estrogen interactions. In breast cancer. J Pineal Res 2005; 38(4): 217-222.
23. Becker-Andrem M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormonemelatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. J Biol Chem 1994; 269(46): 28531-28534.
24. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. Endocrinology 1996; 137(12): 5739-5742.
25. Zhou D, Clarke P, Wang J, Chen S. Identification of a promoter that controls aromatase expression in human breast cancer and adipose stromal cells. J Biol Chem 1996; 271(25): 15194-14202.
26. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M, et al. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 86(3-5): 219-224.
27. Radomir M, Russel J, Natalia S, Rennolds SO, Andrzej TS. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. Molecular and Cellular Endocrinology 2012; 351(2): 152-166.

28. Quastel MR, Rahamimoff R. Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. Br J Pharmacol Chemother 1995; 24(2): 455-461.
29. Sjoblom M, Safsten B, Flemstrom G. Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2003; 284(6): G1034-G1044.
30. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res 2004; 36(1): 1-9.
31. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers. J Physiol Pharmacol 2006; 57(Suppl 5): 51-66.
32. Brzozowska I, Ptak-Belowska A, Pawlik M, Pajdo R, Drozdowicz D, Konturek SJ, et al. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin in the mechanism of gastric defense. J Physiol Pharmacol 2009; 60(Suppl 7): 47-56.
33. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution function and physiological role of melatonin in the lower gut. World J Gastroenterol 2011; 17(34): 3888-2898.
34. Kos-Kudla B, Ostrowska Z, Kozlowski A, Marek B, Ciesielska-Kopacz N, Kudla M, et al. Circadian rhythm of melatonin in patients with colorectal carcinoma. Neuro Endocrinol Lett 2002; 23(3): 239-242.
35. Hrushesky WJ, Grutsch J, Wood P, Yang X, Oh EY, Ansell C, et al. Circadian clock manipulation for cancer prevention and control and the relief of cancer symptoms. Integr Cancer Ther 2009; 8(4): 387-397.
36. Dalio MB, Haikel Júnior LF, Dalio RB, Pinto AP, Silva JC, Vespúcio MV, et al. A study of the effects of pinealectomy on intestinal cell proliferation in infant newborn rats. Acta Cir Bras 2006; 21(1): 16-20.
37. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. Neuro Endocrinol Lett 2001; 22(1): 45-47.
38. Blask DE, Wilson ST, Zalatan F. Physiological melatonin inhibition of human breast cancer cell growth in vitro: evidence for a glutathione-mediated pathway. Cancer Res 1997; 57(10): 1909-1914.
39. Farriol M, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. J Appl Toxicol 2000; 20(1): 21-24.
40. Panzer A, Viljoen M. The validity of melatonin as an onco static agent. J Pineal Res 1997; 22: 184-202.
41. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Melatonin potentiates flavone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. Int J Cancer 2005; 116(2): 236-242.
42. García-Navarro A, González-Puga C, Escames G, López LC, López A, López-Cantarero M, et al. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. J Pineal Res 2007; 43(2): 195-205.
43. Karasek M, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Winczyk K, Paw likowski M. Expression of melatonin MT (1) and MT (2) receptors, and ROR alpha (1) receptor in transplantable murine Colon 38 cancer. Neuro Endocrinol Lett 2002; 23(Suppl 1): 55-60.

44. Winczyk K, Fuss-Chmielewska J, Lawnicka H, Pawlikowski M, Karasek M. Luzindole but not 4-phenyl-2-propionami dotetralin (4P-PDOT) diminishes the inhibitory effect of melatonin on murine Colon 38 cancer growth in vitro. Neuro Endocrinol Lett 2009; 30: 657-662.
45. Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. Int J Exp Pathol 2006; 87(2): 81-87.
46. Martins E, Fernandes LC, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. The effect of melatonin chronic treatment upon macro-phage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. J Neuroimmunol 1998; 82(1): 81-89.
47. Zhang S, Qi Y, Zhang H , He W , Zhou Q , Gui S, et al. Melatonin inhibits cell growth and migration, but promotes apoptosis in gastric cancer cell line, SGC7901. Biotech Histochem 2013; 88(6): 281-289.