

بررسی اثر آنژیوتانسین II بر میزان بیان شدن پروتئین‌های اینتگرین α_3 ، α_V و β_3 در سلول‌های ملانوما B16-F10

نیوشا اسفندیاری‌یگانه^۱ (Pharm.D.)، نازنیک گالوستانیان^۱ (Pharm.D.)، آیدا نصیرزاده گلجاهی^۱ (Pharm.D.)، مریم قدرتی^۲ (B.Sc.)، رویینا بغوزیان^۳ (M.Sc.)، الهام رسولی^۱ (Pharm.D.)، الهام عباسی^۱ (Pharm.D.)، ارکیده قربان‌دادرسی^۱ (Ph.D.)، مازیار محمدآخوان^{۲*} (Ph.D.)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران

۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان شهدای تجریش، مرکز تحقیقات پوست، آزمایشگاه پروتئین و آنزیم

۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ایمونولوژی

چکیده

سابقه و هدف: گزارش‌های مختلف بیان گر نقش آنتاگونیست‌های گیرنده آنژیوتانسین II در مهار رشد تومورهای مختلف است. در چند مطالعه اخیر مشاهده شده که آنژیوتانسین II می‌تواند بیان شدن برخی از فاکتورهای مهم در رشد تومورها را افزایش دهد. علاوه بر این نقش اینتگرین‌ها در رشد و متاستاز سلول‌های توموری مختلف اهمیت زیادی دارد ولی نقش آنژیوتانسین II در میزان بیان شدن اینتگرین‌های سلول تومورال هنوز معلوم نیست. مواد و روش‌ها: با تزریق سلول‌های B16-F10 به صورت sc در موش‌های آزمایشگاهی C57، تومور ملانوما ایجاد گردید. لوزارتان از طریق داخل صفاقی به حیوانات آزمایشگاهی تزریق گردید. علاوه بر آن با کشت سلول‌های B16-F10، این سلول‌ها در معرض آنژیوتانسین II با یا بدون حضور لوزارتان برای مدت دو ساعت قرار گرفتند و میزان بیان شدن اینتگرین‌های α_3 ، α_V و β_3 توسط روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. روز ۱۸ یافته‌ها: در مدل حیوانی، اندازه تومور در حیوانات گروه لوزارتان نسبت به گروه کنترل در دو روز آخر اندازه‌گیری به‌صورت معنی‌داری کوچک‌تر بود (روز ۱۷ و ۱۸ به ترتیب $P=0.013$ ، $P=0.0015$). در کشت سلول‌های B16-F10، آنژیوتانسین II موجب افزایش بیان شدن اینتگرین‌های مورد مطالعه گردید، $\text{Integrin } \alpha_V$ ($P=0.049$)، $\text{Integrin } \beta_3$ ($P=0.037$)، $\text{Integrin } \alpha_3$ ($P=0.016$). لوزارتان موجب مهار این اثر شد. نتیجه‌گیری: نقش آنژیوتانسین II در افزایش رشد تومور ملانوما می‌تواند به دلایلی از جمله افزایش بیان شدن اینتگرین‌های α_3 ، α_V و β_3 بروز نماید که توسط لوزارتان مهار می‌شود. در مدل حیوانی ملانوما نیز لوزارتان با مهار گیرنده‌های AT_1 موجب مهار رشد تومور گردید. این مطالعه اهمیت استفاده از داروهایی مثل لوزارتان را در کنار درمان‌های استاندارد تومورها بیان می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: ملانوما، اینتگرین، آنژیوتانسین II، لوزارتان

انواع مختلف سرطان از جمله سرطان‌های پستان، ریه، معده،
تخمدان و ملانوما می‌باشد [۵-۱].

مقدمه

شواهد نشان‌دهنده ارتباط میان آنژیوتنزیس و متاستاز در

به تازگی نقش آنتاگونیست‌های رسپتور AT₁ در مهار رشد تومورهای مختلف مورد توجه قرار گرفته است. در سلول ملانوما انسانی آنتیوتانسین II و گیرنده (AT₁) بیان می‌شود و مشاهده شده است که در موش‌های فاقد گیرنده ی (AT₁) به طور چشم‌گیری عروق کاهش پیدا کرده است [۱۶].

با توجه به مطالب گفته شده در بالا بررسی ارتباط احتمالی میان آنتیوتانسین II و اینتگرین‌ها اهمیت می‌یابد. در صورتی که ارتباط معنی‌داری از نظر اثر آنتیوتانسین II بر میزان بیان اینتگرین‌ها یافت شود مکانیسم اثر و امکان استفاده از داروهای مهارکننده رسپتور آنتیوتانسین II در درمان ملانوما روشن‌تر گردیده و بررسی این موضوع در بیماران کاربرد واضح‌تری می‌یابد.

مواد و روش‌ها

تهیه دارو. آنتیوتانسین II، leupeptin، aprotinin، phenyl methyl sulfonyl fluorid (PMSF) از سیگما (سنت‌لوئیس، MO، USA) خریداری شد، لوزارتان (Santacruz)، Dimethyl Sulfoxide (Merck) و RPMI-1640، سرم جنین گاو (FBS)، تریپسین، پنی‌سیلین و استرپتومایسین از GIBCO خریداری شد. تمامی آنتی‌بادی‌های اولیه در برابر اینتگرین‌های α_3 ، β_3 ، α_v و اکتین و هم‌چنین آنتی‌بادی ثانویه HRP goat anti rabbit از Santacruz خریداری شد. کیت سنجش اندازه‌گیری پروتئین BCA، فیلم CL-Xposure و ECL وسترن‌بلات از pierce (USA، IL، Rockford) خریداری شد. غشاهای Polyvinylidenedifluoride (PVDF) از (USA، Millipore Bedford) بود. تمام مواد و معرف‌های مورد استفاده از Merck خریداری شد.

آزمایشات حیوانی موش‌های آزمایش‌گاهی C57 ماده با وزن حدود ۲۰ گرم که همگی از انستیتو پاستور ایران دریافت شده بودند به صورت اتفاقی در دو گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند، برای این‌که موش‌های مورد مطالعه با شرایط حیوان خانه تطابق پیدا کنند به مدت یک هفته پیش از شروع کار در

برخی گزارش‌ها حاکی از احتمال نقش آنتیوتانسین II در تقویت بیان شدن انواع اینتگرین‌ها می‌باشد [۶ و ۷] که به عنوان مولکول‌های اتصال سلولی توصیف می‌شوند. این گلیکوپروتئین‌ها هترودیم‌هایی از زنجیره‌های پلی‌پپتیدی آلفا (α) و بتا (β) هستند [۸] که در فرآیندهای سلولی زیادی نظیر مهاجرت، حمله، تکثیر، متاستاز و در انواع زیادی از سرطان‌ها نظیر ملانوما دخالت دارند. به علاوه نقش مهمی در آنویکیس (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در نتیجه جدا شدن سلول از ماتریکس)، انتقال سیگنال، بیان ژن، تکثیر سلولی، کنترل آپوپتوز، التهاب، تمایز بافت، هموستاز و آپوپتوز دارند [۱۳-۸]. به استثناء گلوبول‌های قرمز، تمام سلول‌های انسانی یک یا چند هترودیم اینتگرین را بیان می‌کنند [۱۴].

به نظر می‌رسد که بیان برخی از زیرواحدهای اینتگرین‌ها در سلول‌های تومور ملانوما در مقایسه با ملانوسیت‌های طبیعی افزایش می‌یابد. به طور مثال زیرواحدهای β_1 ، β_3 ، α_v و α_3 از جمله این زیرواحدها هستند [۱۵].

تجزیه و تحلیل در مراحل مختلف پیش‌رفت سرطان پوست نشان داده است که افزایش بیان اینتگرین α_v ، β_3 و β_1 انتقال ملانوما از مرحله رشد شعاعی به فاز رشد عمودی را زیاد می‌کند. این پدیده‌ای است که بیش‌تر با رگ‌زایی جدید و سریع و متاستاز سلول‌های تومور ارتباط دارد. این اینتگرین‌ها برای بقای سلول‌های اندوتلیال تومور لازم بوده و مهار آن‌ها موجب مهار رگ‌زایی در تومور می‌گردد [۱۵].

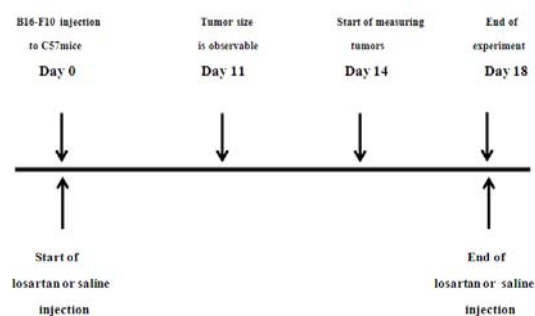
گزارش شده که آنتیوتانسین II بیان اینتگرین‌های β_5 ، β_3 ، β_1 و α_v را در فیبروبلاست‌های قلبی با فعال‌سازی گیرنده (AT₁) کنترل می‌کند که این سوال را به ذهن می‌آورد که آیا این اکتاپیتید در تغییر بیان شدن اینتگرین‌ها در سلول ملانوما هم نقش دارد یا نه؟ از جمله دلایل اهمیت اینتگرین‌ها در رشد و متاستاز تومور این واقعیت است که در حال حاضر آنتاگونیست چند اینتگرین ($\alpha_5\beta_1$ ، $\alpha_v\beta_3$ و $\alpha_v\beta_5$) تحت ارزیابی در کارآزمایی‌های بالینی برای تعیین پتانسیل به عنوان مصرف داروهای خاص برای سرطان می‌باشند [۶].

شدند و در انکوباتور CO₂ ۵٪ و ۳۷ °C نگه‌داری شدند. برای آزمایش، سلول‌ها (۱۰۶ سلول در هر فلاسک) در فلاسک ۷۵ cm² در ۸ میلی‌لیتر محیط رشد کردند. در مورد آزمایشات حیوانی که شامل تزریق سلول‌ها به موش‌های C57 بود، سلول‌های کشت شده با کمک تریپسین (۰.۵٪ w/v) به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق جدا می‌شد. سپس با استفاده ۳ برابر حجم تریپسین از RPMI-1640 رقیق شده و سلول‌ها توسط سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد ته‌نشین می‌شدند. محلول رویی بیرون ریخته شد و ۱ میلی‌لیتر RPMI-1640 به هر لوله اضافه شد و در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌شدند. این سلول‌ها پس از شمارش در نرمال سالین پراکنده شده و با تعداد و حجم مناسب برای تزریق استفاده می‌شدند. در زمانی که نیاز به استفاده از سلول‌ها برای آزمایشات شامل انکوباسیون با آنژیوتانسین II بود به مدت ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت بدون سرم تعویض می‌شد. سلول‌های مورد آزمایش با RPMI-1640 بدون داروی آنژیوتانسین (0M, 10⁻⁸M) یا در ترکیب با لوزارتان (10⁻⁶M) در سرم انکوبه می‌گردید و ۲ ساعت زمان انکوبه شدن به منظور تعیین اثر آنژیوتانسین II با یا بدون لوزارتان بر بیان اینتگرین‌های α₃, β₃ و α_v در سلول B16F10 مورد استفاده قرار گرفت [۱۹]. پس از گذشت زمان انکوبه شدن، سلول با استفاده از تریپسین به همان ترتیبی که در بالا گفته شد جدا شده و رسوب سلول‌ها در دمای ۸۰ °C برای استفاده‌های بعدی ذخیره شد.

با استفاده از روش وسترن‌بلات، تغییر در سطح بیان عوامل متعددی ناشی از آنژیوتانسین II در سلول‌های ملانوما مورد مطالعه قرار گرفت. اثر مهاری لوزارتان نیز به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. پس از پروسه انکوباسیون با آگونیست و آنتاگونیست، سلول‌ها در دمای ۸۰ °C نگه‌داری شدند تا در چندین آزمون وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه پروتئین‌های هدف استفاده شوند. سلول ملانوما موش

حیوان‌خانه نگه‌داری شدند. در طول آزمایش این موش‌ها در دو قفس جداگانه پلی‌اتیلنی در یک چرخه شبانه‌روزی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و هم‌چنین دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و آب و غذا در دسترس آن‌ها قرار داشت.

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود پس از تزریق سلول‌های کشت شده ملانوما (B16-F10 روز ۰) به تعداد پانصد هزار سلول در ۲۰۰ میکرولیتر نرمال سالین در زیر جلد موش‌های C57 مورد آزمایش، طی حدود یازده روز تومور قابل مشاهده در محل تزریق این موش‌ها مشخص گردید. بلافاصله پس از تزریق سلول‌ها هر روز در ساعت مشخص مقدار ۱۰۰ میکرولیتر لوزارتان با غلظت ۲۰۰ mg/kg و یا نرمال سالین به موش‌های گروه‌های مناسب به صورت داخل صفاقی تزریق می‌گردید. دوز لوزارتان با استفاده از داده‌های مقاله Otake و هم‌کاران تعیین گردید [۱] و با توجه به این‌که از روز چهاردهم تومورها در تمام موش‌ها ایجاد شد هر روز قبل از تزریق دارو یا نرمال سالین اندازه تومور با کمک یک کولیس و با فرمول $V=[L \times W^2] \times 0.52$ ثبت می‌گردید. در این فرمول V برای حجم تومور، L برای طول تومور و W برای نشان دادن قطر تومور استفاده گردیده‌اند [۱۷].



شکل ۱. نمودار زمانی انجام آزمایشات حیوانی

کشت سلولی. همان‌گونه که در مقاله دیگری توصیف شده است، سلول‌های ملانوما موشی B16-F10 در محیط RPMI-1640 همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS) کشت داده

HRP goat anti rabbit IgG (1:20000) (Sc2004) بسیار متاستاتیک B16F10 با کد بانک سلولی NCBI C-540 از بانک سلولی ملی ایران (انسستیتوپاستور، تهران، ایران) دریافت شده است. اندازه‌گیری پروتئین تام. سلول‌های B16F10 در بافر لیزکننده زیر با کمک دست‌گاه هموژنایزر ultra turrax هموژن شدند.

برای اندازه‌گیری اینتگرین α_3 از آنتی‌بادی اولیه ضد اینتگرین α_3 (1:100) (Sc 28665) و آنتی‌بادی ثانویه HRP goat anti rabbit IgG (1:2000) (Sc2004)، برای اندازه‌گیری اینتگرین β_3 از آنتی‌بادی اولیه ضد اینتگرین β_3 (1:100) (Sc 14009)، آنتی‌بادی ثانویه HRP goat anti rabbit IgG (1:2000) (Sc2004) و در نهایت برای اندازه‌گیری اکتین از آنتی‌بادی ضد اکتین (1:300) (Sc130656) و آنتی‌بادی ثانویه HRP goat anti rabbit IgG (1:2000) (Sc2004) استفاده گردید.

تشخیص Chemiluminescence باندها با استفاده از کیت ECL با توجه به دستورالعمل سازنده صورت گرفت و نتایج توسط یک دانسیتومتر (GS-800) و نرم‌افزار Gel-Pro analyzer imaging اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری. از آزمون آماری t-Test: paired two sample for means برای مقایسه بین دو گروه مجزا توسط برنامه Excel استفاده شد. در این آزمون زمانی که $p < 0.05$ باشد، تفاوت‌های آماری معنی‌دار تلقی می‌شوند. نتایج ارائه شده از ۳ آزمایش مستقل به دست آمده است.

نتایج

لوزارتان با غلظت به‌کار رفته توانست میزان رشد تومور را به‌صورت معنی‌داری مهار نماید. همان‌گونه که در شکل ۲ می‌توان مشاهده کرد تعداد 5×10^5 سلول B16-F10 به‌صورت زیر جلدی در پهلوی راست موش‌های C57 تزریق گردید تا تومور ملانوما در این موش‌ها ایجاد گردد. لوزارتان (200 mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه لوزارتان تزریق گردید و نرمال سالین هم به موش‌های گروه کنترل به همان ترتیب تزریق شد. اندازه تومور در حیوانات گروه لوزارتان نسبت به گروه کنترل در دو روز آخر اندازه‌گیری به‌صورت معنی‌داری کوچک‌تر می‌باش بود (روز ۱۷ و ۱۸ به ترتیب $P = 0.0015$, $P = 0.013$). به این ترتیب مشاهده می‌گردد که استفاده از یک داروی مهارکننده

برای اندازه‌گیری اینتگرین α_v از آنتی‌بادی اولیه ضد اینتگرین α_v (1:100) (sc10719) و آنتی‌بادی ثانویه

Buffer A: 137 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 1% tergitol NP-40, 0.5mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1µg/mL leupeptin, 10µg/mL aprotinin
Buffer B: 137 mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 1% tergitol NP-40, 0.5mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1µg/mL leupeptin, 10µg/mL aprotinin, 0.1% sodium dodecylsulfate [SDS], 1% Triton X-100

سلول لیز شده برای حذف اجزای نامحلول به مدت ۳۰ دقیقه در 4°C ، با دور $g = 12500$ سانتریفوژ شد. سپس غلظت پروتئین تام با استفاده از کیت سنجش پروتئین میکرو BCA با توجه به دستورالعمل کیت تعیین شد. عصاره سلولی در 80°C - ذخیره شده تا مورد استفاده قرار گیرد.

همان‌گونه که در مقاله دیگری توصیف شده است، بیان اینتگرین‌های α_3 و β_3 و α_v در سلول لیز شده B16F10 توسط وسترن‌بلات مورد بررسی قرار گرفت [۱۹].

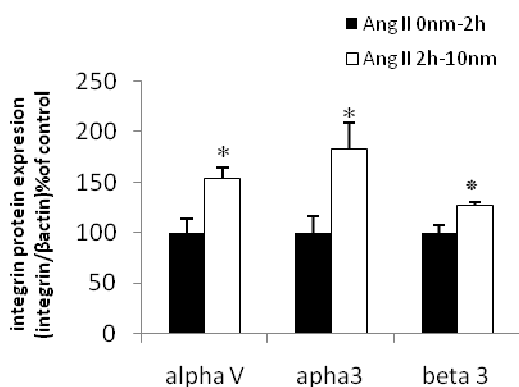
برای SDS-PAGE، مقادیر ۱۰۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۷/۵٪ قرار گرفت و توسط الکتروفورز از هم جدا شدند. پروتئین‌ها به غشاء PVDF منتقل شده و پس از آن با شیر خشک ۵٪ و tween 20 ۱٪ در بافر Tris-buffered saline (TBS) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق بلاک شدند. غشاء در تماس با آنتی‌بادی اولیه علیه پروتئین‌های هدف به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و سپس با آنتی‌بادی ثانویه مناسب به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. اکتین به عنوان استاندارد داخلی برای تجزیه و تحلیل وسترن‌بلات استفاده شد. برای تعیین کمیت پروتئین‌های هدف، نتیجه اسکن فیلم دانسیتومتر به نسبت میزان اکتین محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری اینتگرین α_v از آنتی‌بادی اولیه ضد اینتگرین α_v (sc10719) (1:100) و آنتی‌بادی ثانویه

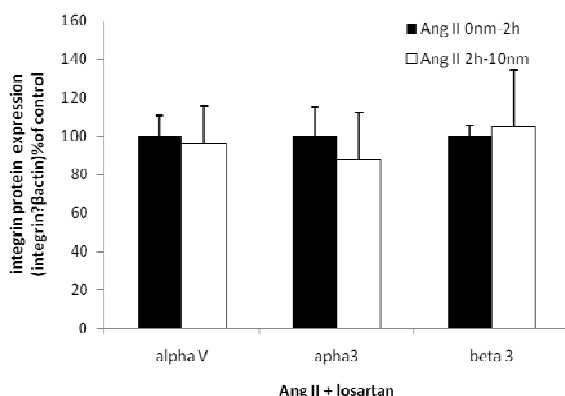
شکل ۳ نشان داده شده است، آنژیوتانسین II با غلظت ۱۰ نانومولار در زمان مورد نظر (۲ ساعت) سطح بیان اینتگرین های α_3 ، α_v و β_3 را افزایش داد.

Integrin α_v (P value: 0.049), Integrin α_3 (P value: 0.016), Integrin β_3 (P value: 0.037)

همچنین برای تأیید شرکت داشتن گیرنده AT1 در اثر افزایش آنژیوتانسین II در بیان اینتگرین های α_3 ، α_v و β_3 یک سری آزمایشات مستقل با همان غلظت آنژیوتانسین II و زمان انکوباسیون انجام شد. با این تفاوت که سلول های ملانوما در معرض آنژیوتانسین II و لوزارتان با غلظت 10^{-6} مولار) قرار داده شدند.

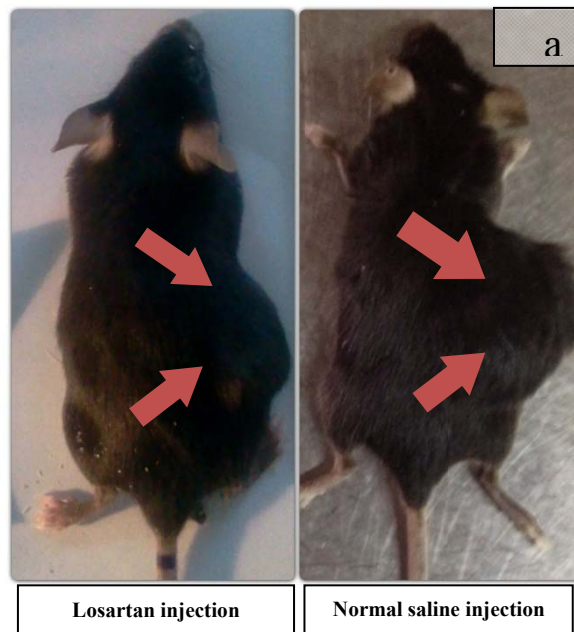


شکل ۳- افزایش بیان اینتگرین های α_3 ، α_v و β_3 در سلول های ملانوما توسط آنژیوتانسین II. سلول های B16-F10 ۲ ساعت در معرض آنژیوتانسین II با غلظت (۱۰ نانومولار) قرار گرفتند. نتایج به صورت درصد نسبت به گروه کنترل در همان زمان انکوباسیون نشان داده شده است. هر مقدار نشان دهنده Mean±SEM می باشد. (*p<0.05) (n=3)

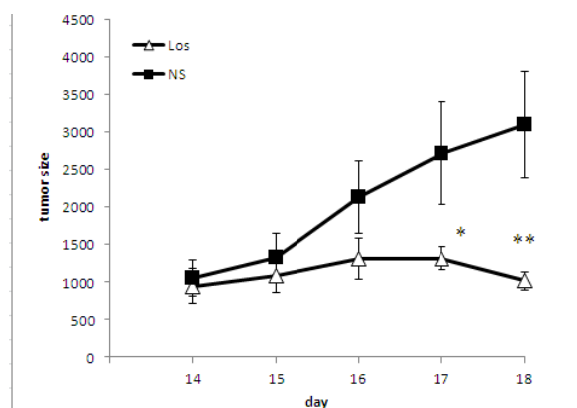


شکل ۴. مهار اثر افزایشی آنژیوتانسین II بر بیان اینتگرین ها توسط لوزارتان. سلول های B16-F10 ۲ ساعت در معرض آنژیوتانسین II با غلظت (۱۰ نانومولار) و لوزارتان با غلظت 10^{-6} مولار) قرار گرفتند. نتایج به صورت درصد نسبت به گروه کنترل در همان زمان انکوباسیون نشان داده شده است. هر مقدار نشان دهنده Mean±SEM است. (n=3)

گیرنده های آنژیوتانسین II می تواند به خوبی در مهار رشد تومور موثر باشد. برای بررسی این که آیا مکانیسم عمل کرد آنژیوتانسین II در سلول های ملانوما شامل تغییر میزان بیان اینتگرین های α_3 ، α_v و β_3 می شود یا نه از یک مدل کشت سلول های ملانوما موشی استفاده گردید.



b



شکل ۲. مهار رشد تومور ملانوما در موش های C57 توسط لوزارتان. (a) لوزارتان تزریقی در موش های مبتلا به تومور ملانوما توانست جلوی رشد تومور را بگیرد. (b) در موش هایی که لوزارتان دریافت می کردند، اندازه تومور به صورت معنی داری کوچکتر از گروه کنترل بود که نرمال سالین دریافت می نمودند. هر مقدار نشان دهنده Mean±SEM می باشد. (n = 7) (ANOVA, *p<0.05, ** p<0.01)

مقدار غلظت پروتئین تام سلول های B16-F10 توسط روش میکرو BCA و سطح بیان اینتگرین های α_3 ، α_v و β_3 توسط روش وسترن بلات اندازه گیری شد. همان طور که در

چگونگی و مکانیسم چنین اثر مفیدی در تومورهای مختلف آغاز شود [۱۹،۴،۱].

بر اساس نتایج این مطالعه تزریق داخل صفاقی لوزارتان توانست جلوی رشد تومورها را به صورت معنی داری بگیرد که در انطباق با نتایج سایر مطالعاتی است که از این دارو در رابطه با تومورها استفاده کرده‌اند [۱]. اثر آنتاگونیست در مهار رشد تومور به خوبی نقش مرکزی آگونیست گیرنده‌های مهار شده را در رشد تومور سرطانی روشن می‌کند. در این مورد استفاده از لوزارتان به عنوان داروی کمکی در درمان دست کم برخی از تومورها توجیه علمی دارد. اما این که مکانیسم اثر آنژیوتانسین II در رشد تومور ملانوما چیست سوال دیگری است که نیاز به بررسی‌های متعدد دارد. به عنوان مثال در مطالعه دیگری در همین رابطه نشان داده شده بود که آنژیوتانسین II موجب افزایش بیان شدن Vascular endothelial growth factor و همچنین برخی از انواع Matrix Methalo Proteinase می‌گردد [۱۹]. باید توجه داشت که این عوامل همگی در رشد و متاستاز تومورها اهمیت فراوانی دارند و مطالعات مختلف نقش آن‌ها را در این مورد آشکار کرده‌اند [۲۴،۲۳،۲۲،۸].

از سوی دیگر پیشرفت تومور با افزایش برخی اینتگرین‌ها نسبت مستقیمی دارد، مهم‌ترین این اینتگرین‌ها $\alpha_v\beta_3$ ، $\alpha_3\beta_1$ است که از اهمیت خاصی برخوردارند. آنتی‌بادی این اینتگرین‌ها باعث سرکوب پیشرفت مهاجرت در ملانوما می‌شود [۲۵].

به عنوان مثال آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مهارکننده اینتگرین β_1 به میزان قابل توجهی چسبندگی سلول‌های سرطان پستان را کاهش داده‌اند. علاوه بر این، آنتی‌بادی‌های مشابه قادر به ممانعت از تهاجم سلول‌های سرطان پستان انسان از غشای پایه در محیط *in vitro* شده‌اند [۷].

با توجه به مطالب ذکر شده اثر آنژیوتانسین II در افزایش بیان اینتگرین‌ها اهمیت می‌یابد و به نظر می‌رسد که این فاکتورها بخشی از مکانیسم بعد از گیرنده هستند که موجب

همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد لوزارتان با غلظت 10^{-6} مولار به طور کامل مانع از عملکرد آنژیوتانسین II در افزایش سطح بیان اینتگرین‌های α_3 ، α_v و β_3 می‌شود.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه با استفاده از سلول‌های B16-F10 در موش‌های C57 تومور ملانوما ایجاد گردید و به عنوان مدل حیوانی برای بررسی اثر لوزارتان در مهار رشد تومور مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر آن از سلول‌های کشت شده B16-F10 به عنوان مدل سلولی برای بررسی اثر آنژیوتانسین II بر میزان بیان اینتگرین‌های α_3 ، α_v و β_3 استفاده شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر آنژیوتانسین II نقش مهمی در افزایش سرعت رشد تومور ملانوما دارد. به نظر می‌رسد که بخشی از این اثر مربوط به گیرنده AT_1 می‌باشد و با افزایش اینتگرین‌های α_3 ، α_v و β_3 در سلول‌های تومورال اعمال می‌گردد.

دو زیرگروه عمده از گیرنده آنژیوتانسین II AT_1 و AT_2 وجود دارد. در گونه‌های موش گیرنده AT_1 بیش تر به AT_{1a} و AT_{1b} تقسیم می‌شود. بسیاری از فعالیت‌های آنژیوتانسین II در سیستم قلب و عروق از طریق گیرنده AT_1 صورت می‌گیرد، و در جوندگان به واسطه گیرنده AT_{1a} است [۱۸].

مقالات متعددی نقش آنژیوتانسین II در رشد تومورهای مختلف را بررسی کرده‌اند [۲۱،۲۰،۱۹،۱۸،۵،۴،۳،۲]. حضور گسترده گیرنده AT_1 و اثر مهارکننده‌های آنژیوتانسین II در رشد و تهاجم سرطان نشان می‌دهد که سیستم رنین آنژیوتانسین در بیولوژی سرطان اهمیت دارد [۳،۲،۱]. هم‌چنین در سلول‌های ملانومای انسانی گیرنده AT_1 و پروتئین آنژیوتانسین II بیان می‌شوند [۱۳]. در بسیاری از تومورها مهار این گیرنده‌ها و یا کاهش تولید آنژیوتانسین II می‌تواند موجب مهار رگ‌زایی و کاهش رشد تومور گردد. درک این مسئله که استفاده از داروهای مهارکننده تولید یا عملکرد آنژیوتانسین II می‌تواند به عنوان یک عامل کمکی در درمان سرطان کاربرد داشته باشد موجب شد که بررسی

AT₁ در جلوگیری از رشد تومورهای ملانوما باشد و همچنین مکانیسم اثر آنژیوتانسین II را بر روی رشد و متاستاز تومور تا حدودی روشن می‌نماید. لوزارتان که در حال حاضر به عنوان یک دارو در بازار موجود است با توجه به نتایج مطالعه حاضر ممکن است به عنوان دارو کمکی برای سرکوب پیشرفت ملانوما در انسان توصیه شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری آقایان دکتر عباسی، دکتر وثوق و آقای غیبی در مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

- [1] Otake AH, Mattar AL, Freitas HC, Machado CM, Nonogaki S, Fujihara CK, et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 79-87.
- [2] Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nagasaka T, Nawa A, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumour angiogenesis and patient survival. *Br J Cancer* 2006; 94: 552-560.
- [3] Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT₁a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 441-447.
- [4] Wang L, Cai SR, Zhang CH, He YL, Zhan WH, Wu H, Peng JJ. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on lymphangiogenesis of gastric cancer in a nude mouse model. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2008; 11: 565-568.
- [5] Puddfoot JR, Udeozo UK, Barker S, Vinson GP. The role of angiotensin II in the regulation of breast cancer cell adhesion and invasion. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 895-903.
- [6] Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, et al. Angiotensin II enhances integrin and α -Actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 2000; 35: 273-279.
- [7] Berry MG, Goode AW, Puddfoot JR, Vinson GP, Carpenter R. Integrin beta 1 upregulation in MCF-7 breast cancer cells by angiotensin II. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 25-29.
- [8] Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 195-222.
- [9] Kramer RH, Vu M, Cheng YF, Ramos DM. Integrin expression in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 49-59.
- [10] Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 1990; 50: 6757-6764.
- [11] Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 816-826.
- [12] Hsueh WA, Law RE, Do YS. Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension* 1998; 31: 176-180.
- [13] Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007; 8: 215.

اعمال اثر آنژیوتانسین II در افزایش رشد و متاستاز تومور ملانوما می‌شود.

نکته دیگر در این میان این است که تفاوت بین مطالعات روی بافت تومور و سلول‌های کشت داده شده می‌تواند به وجود انواع مختلفی از سلول‌ها در توده تومور ارتباط داشته باشد. گرچه در یک بافت تومور مانند ملانوما بخش قابل توجهی از سلول‌ها، سلول‌های ملانوما می‌باشند [۲۶]، اما کاهش سلول‌های سرطانی در بافت‌های تومور نسبت به مدل کشت سلولی ممکن است باعث کاهش غلظت هر نوع پروتئین بیان شده از سلول‌های سرطانی شود. هم‌چنین این تفاوت اجازه نمی‌دهد که مطالعه روی بافت تومور به طور خاص بر روی سلول‌های بدخیم سرطانی متمرکز شود. این مسئله ضرورت استفاده از روش‌های کشت سلول‌های توموری را در چنین مطالعاتی یادآور می‌شود. از سوی دیگر استفاده از سلول‌های سرطانی کشت داده شده هر گونه تداخل را بین سلول‌های مختلف و عوامل آزادشده در بافت سرطانی حذف می‌کند و این تفاوت‌ها در چگونگی تفسیر و توجیه نتایج آزمایشگاه اهمیت می‌یابند. بنابراین باید در نظر بگیریم که نتایج متفاوت به دست آمده در مطالعات کشت سلولی و بافت تومور نباید لزوماً یکسان باشد و هر کدام به تنهایی اهمیت دارند و مکمل هم می‌باشند [۱۹].

مکانیسم اثر آنژیوتانسین II بر بیان اینتگرین‌ها در سلول‌های ملانوما B16-F10 از طریق فعال شدن گیرنده‌های AT₁ واقع بر روی این سلول‌ها است. گیرنده AT₁ در سلول‌های مختلف در بافت‌های تومور از جمله ماکروفاژهای تومور، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عضله صاف عروق و سلول‌های ملانوما حضور دارد. بنابراین تجزیه و تحلیل اثر آنژیوتانسین II در برخی از مولکول‌های مهم مانند اینتگرین‌ها در سلول‌ها و بافت‌های سرطانی ضرورت دارد. اثر آنژیوتانسین II بر سلول‌های ملانوما B16-F10 بیان عوامل مختلفی را افزایش می‌دهد و اثر فزاینده‌ای در رشد تومور و متاستاز دارد. این نتایج ممکن است نشانگر حداقل بخشی از دلیل توانایی لوزارتان به‌عنوان مهارکننده گیرنده

- [21] Rodrigues-Ferreira S, Abdelkarim M, Dillenburg-Pilla P, Luissint AC, di-Tommaso A, Deshayes F, et al. Angiotensin II facilitates breast cancer cell migration and metastasis. *PLoS One* 2012; 7: e35667.
- [22] Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 221-233.
- [23] Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 1042-1050.
- [24] Brinkerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase: A tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 207-214.
- [25] Tsuji T, Kawada Y, Kai-Murozono M, Komatsu S, Han SA, Takeuchi K, et al. Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Cvlin Exp Metastasis* 2002; 19: 127-134.
- [26] Smith LM, Nesterova A, Alley SC, Torgov MY, Carter PJ. Potent cytotoxicity of an auristatin-containing antibody-drug conjugate targeting melanoma cells expressing melanotransferrin/p97. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1474-1482.
- [14] Mitjans F, Sander D, Adán J, Sutter A, Martinez JM, Jäggle CS, et al. An anti-av-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma. *J Cell Sci* 1995; 108: 2825-2838.
- [15] Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in Melanoma. *Semin Oncol* 2007; 34: 555-565.
- [16] Ribatti D, Annese T, Longo V. Angiogenesis and melanoma cancers. 2010; 2: 114-132.
- [17] Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor β receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 22044-22049.
- [18] Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 2003; 112: 67-75.
- [19] Akhavan MM, Karimi M, Ghodrati M, Falahtpishe H. AT1 receptors activation enhances the expression of MMP-2, MMP-13 and VEGF but not MMP-9 in B16F10 melanoma cells. *Pak J Biol Sci* 2011; 14: 821-830.
- [20] Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1675-1684.

Effects of angiotensin II on expression of α_3 , α_v and β_3 integrin proteins in B16-F10 melanoma cells

Newsha Esfandiary Yeganeh (Pharm.D)¹, Nazenik Galustanian (Pharm.D)¹, Aida Nasirzadeh Goljahi (Pharm.D)¹, Maryam Ghodrati (B.Sc)², Roobina Boghuzian (M.Sc)³, Elham Rasouli (Pharm.D)¹, Elham Abbasi (Pharm.D)¹, Orkideh Ghorban Dadrass (Ph.D)¹, Maziar Mohammad Akhavan (Ph.D)^{*2}

1 - Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran Iran

2 - Skin Research Center- Laboratory of Protein and Enzyme, Shahid Beheshti University (M.C), Shohada-e Tajrish Hospital, Tehran, Iran

3 - Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 3 feb 2013; Accepted: 12 Feb 2013)

Introduction: Several reports indicated the role of angiotensin II antagonists in suppression of different tumors. Some of the recent studies point to the increasing effect of angiotensin II on expression of important factors regarding to the tumor growth. Also the role of integrins in growth and metastasis of tumoral cells is very important but the role of angiotensin II in the expression of integrins is not clear yet.

Materials and Methods: Melanoma tumors were induced in C57 mice using S.C. injections of B16-F10 cells. Losartan was I.P. injected to C57 mice. Also B16-F10 cells were cultured and incubated with angiotensin II with or without losartan for two hours and the expression of α_3 , α_v and β_3 integrins were studied using western blotting.

Results: Our results indicate the suppressing role of losartan on tumor growth (day17, P=0.013; day18: P=0.0015). In addition angiotensin II increased significantly the expression of studied integrins in B16-F10 cultured cells (integrin α_v : P=0.049; Integrin α_3 : P= 0.016; integrin β_3 : P= 0.037), and losartan completely abolished this effect.

Conclusion: The role of angiotensin II in tumor growth may be because of reasons including its role in elevating the expression levels of α_3 , α_v and β_3 integrins. In animal model of melanoma, losartan suppressed the tumor growth through AT1 receptors inhibition. The present study indicates the importance of the drugs such as losartan besides the standard therapeutic approach for tumors.

Keywords: Melanoma, Integrin, Angiotensin II, Losartan

* Corresponding author: Fax: +98 2122744393 ; Tel: +98 2122744394
m_akhavan@sbmu.ac.ir