Journal of Animal Biology, Summer 2024; 16(4):123-136

Research Article

Evaluating the effect of Morphine and its combination with Naloxone, Cannabinoid receptor type 1 inhibitor (Am251), phospholipase inhibitor (U73122), and Pregabalin on Viability of YM1 Esophageal Cancer Cells

Hossein Mohammadpour Kargar*, Mehyar Ansari

Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
*Corresponding author: pourkargar@yahoo.com

Received: 10 November 2023 Accepted: 1 June 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.3111560

Abstract

It has been found that morphine may affect proliferation of cancer cells in addition to the effect of analgesia. In this study, the effects of morphine, naloxone, cannabinoid receptor type 1 inhibitor (Am251), phospholipase C inhibitor (U73122) and pregabalin were evaluated on YM1 esophageal cancer cell line viability. Esophageal cancer cell line YM1 cells were propagated in RPMI-1640 medium containing 10% FBS. Then the cells were treated with different doses of drugs for 24 hours and the cell viability was determined by the MTT method. The results were analyzed by one-way ANOVA and LSD post hoc test. The investigation showed that morphine in all three doses (87, 175 and 350 µM) significantly reduced the viability of cells ($p < 0.05$). The addition of 60 µM naloxone to the culture medium could not change the survival rate of esophageal cancer cells. But naloxone along with 350 µM morphine significantly decreased the survival rate compared to the control group ($p < 0.001$) and the naloxone group ($p < 0.02$). Phospholipase C inhibitor (U23177, 1mM) alone ($P < 0.001$) or together with 350 µM morphine decreased cell viability ($p < 0.001$). Also, AM251 140 µM alone ($p < 0.05$) or together with morphine decreased cell viability ($p < 0.001$). Pergabalin with a concentration of 6 µM with 6 mM alone ($p < 0.05$) or together with morphine decreased cell viability compared to the control group ($p < 0.001$) and the ratio of the 350 µM morphine group ($p < 0.01$). Also, cell viability in the group that was exposed to all three compounds was greatly reduced ($p < 0.001$). The results showed that morphine and the drugs investigated in this study can be used as potential options to reduce cell growth in patients with advanced esophageal cancer.

Keywords: Esophageal cancer cell line YM1, Morphine, naloxone, Am251, U73122, Pregabalin**.**

زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره چهارم، تابستان ۱۴۰۳، صفحات ۱۳۶-۱۲۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مرفین و ترکیب آن با نالوکسان، مهارکننده گیرنده کانابینوئید نوع ۱ (Am251)، مهار کننده فسفولیپاز (U73122) و پرگابالین بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی مری YM1

حسین محمدپور کارگر*، مهیار انصاری

گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*مسئول مکاتبات: pourkargar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲

DOI: 10.60833/ascij.2024.3111560

چکیده

مشخص شده است که مورفین می‌تواند غیر از اثر بی‌دردی، بر تکثیر سلول‌های سرطانی مری نیز اثر گذار باشد. در این مطالعه اثر مورفین، نالوکسان، به همراه مهار کننده گیرنده کانابینوئید نوع ۱ (Am251)، مهار کننده فسفولیپاز (U73122) و پرگابالین بر روی رده سلولی سرطان مری YM1 ارزیابی گردید. سلول‌های رده سلولی سرطان مری YM1در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS تکثیر شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف داروها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان زنده ماندن سلول‌ها به روش MTT تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج به روش one way ANOVA و آزمون تعقیبی LSD انجام شد. بررسی‌های انجام شده نشان داد که مورفین در هر سه دوز (۸۷، ۱۷۵ و۳۵۰ میکرومولار) میزان بقای سلول‌ها را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد ($p < ۰/۰۵$). افزودن نالوکسان ۶۰ میکرومولار به محیط کشت نتوانست میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را تغییر دهد. اما نالوکسان به همراه مورفین۳۵۰ میکرومولار میزان بقا را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) و گروه نالوکسان کاهش داد ($p < ۰/۰۲$). مهار فسفولیپاز C با U23177 با غلظت ۱ میکرومولار به تنهایی ($p < ۰/۰۰۱$) و یا همراه مورفین ۳۵۰ میکرومولار میزان بقای سلول‌ها را ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش داد. همچنین AM251 با غلظت ۱۴۰ میکرومولار به تنهایی ($p < ۰/۰۵$) و یا همراه با مورفین ۳۵۰ میکرومولار میزان بقا را ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش داد. پر گابالین با غلظت ۶ میکرومولار به تنهایی ($p < ۰/۰۵$) و یا همراه با مورفین ۳۵۰ میکرومولار زنده‌مانی سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) و نسبت گروه مورفین ۳۵۰ میکرومولار کاهش داد ($p < ۰/۰۱$). همچنین در گروهی که در معرض هر سه ترکیب قرار گرفته بود بقا سلول‌ها بشدت ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش یافت. نتایج نشان داد که مورفین و داروهای مورد بررسی در این مطالعه می‌توانند به عنوان گزینه‌های بالقوه برای کاهش رشد سلولی در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته مری مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: رده سلولی سرطان مری YM1، مورفین، نالوکسان، Am251، U73122، پرگابالین.

مقدمه

سرطان مری با توجه به نرخ مرگ‌ومیر بالا، امروزه یکی از مشکلات جدی پزشکی در جهان بوده و در مجموع هشتمین سرطان رایج و ششمین عامل مرگ‌و میر وابسته به سرطان در کل دنیا محسوب می‌شود (۲). کمربند جغرافیایی‌درگیر در سرطان مری از کشور چین تا نواحی شمالی ایران امتداد یافته است، به‌طوری‌که در شمال کشور ایران و در استان گلستان نرخ بروز سرطان مری بیشتر از سایر نواحی می‌باشد (۱). تریاک قدیمی‌ترین ماده مخدر شناخته شده برای بشر می‌باشد. مورفین مسکن و آرام‌بخشی است که

بسیار مؤثرتر از تریاک خام عمل می‌کند. مورفین اثر ضد دردی خود را از طریق گیرنده‌های اپیوئیدی (μ، δ و κ) که در مغز قرار دارند اعمال می‌کند (۲۳). مشخص شده است که میل ترکیبی مورفین نسبت به گیرنده μ دو برابر بیشتراست (۱۶). مورفین علاوه بر اثر ضد درد قوی، تعدادی از عوارض جانبی نامطلوب از جمله اعتیاد، تحمل، افسردگی تنفسی، سرکوب سیستم ایمنی و یبوست دارد. با وجود معایب ذکر شده در بالا، مورفین همچنان رایج‌ترین گزینه برای مدیریت دردهای شدید، از جمله درد سرطان است (۲۹). در حالی که فارماکولوژی و عملکرد مورفین در CNS به طور گسترده مشخص شده است، هنوز اطلاعات کمی در مورد تأثیر مورفین بر سلول‌های سرطانی وجود دارد (۳۶). برخی از مطالعات گزارش کردند که در غلظت‌های زیاد، مورفین تکثیر سلول‌های توموری را مهار (۳۷) و یا حتی از تمایز سلول‌های نوروبلاستوما SH-SY5Y جلوگیری می‌کند (۱۸). اگرچه بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که مورفین می‌تواند از تکثیر تومورها جلوگیری کند اما مکانیسم آن هنوز نامشخص است. نشان داده شد است که اپیوئیدها رشد سلول‌های T47D را مهار می‌کنند که مکانیسم آن از طریق گیرنده‌های κ و δاپیوئیدی انجام می‌شود (۲۰). بررسی‌ها نشان داده‌اند که مورفین گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را ایجاد نموده و با آزاد کردن سیتوکروم میتوکندریایی c و کاسپاز ۳/۹ و یا کاهش پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2، باعث القا آپوپتوز می‌گردد (۲۷). علاوه بر مسیر میتوکندریایی، مورفین می‌تواند آپوپتوز را با واسطه Fas نیز ایجاد کند (۴۰). ثابت شده است که در شرایط آزمایشگاهی، مورفین با مهار فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (۳۳) از فعالیت و رشد سلول‌های سرطانی دهان HSC-3 جلوگیری نموده و با مسدود کردن چرخه سلولی رشد سلول‌های سرطان سینه MCF-7 را کاهش می‌دهد (۱۱). دیگر اگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی، فنتانیل نیز می‌تواند از رشد سلول‌های سرطان معده جلوگیری و پیشرفت چرخه سلولی آنها را مهار کند (۳۴). تفاوت‌های آشکاری در تعداد سلول‌های نکروز القا شده توسط مورفین بین رده‌های مختلف سلولی وجود دارد. به عنوان مثال، تعداد سلول‌های نکروزه در رده سلولی MCF-7 بیشتر از رده‌های سلولی HL-60 و A549 است. این تفاوت تا حد زیادی به نحوه واکنش رده‌های سلولی به مورفین بستگی دارد. البته باید خاطرنشان کرد که درباره اثر مورفین بر سلول‌های سرطانی گزارشات متناقضی نیز وجود دارد. بطور مثال، گزارش شده است که مورفین تکثیر سلول‌های توموری اندوتلیال را افزایش می‌دهد (۱۹). سرگیوا و همکاران نیز گزارش کردند که مورفین تکثیر سلول‌های میلوئید K562 و T-lymphoma Yurkat را زیاد می‌کند (۳۶). همچنین گزارش شده است که پس از تزریق متیل نالترکسون، آنتاگونیست گیرنده μ، رشد تومور ریوی ۹۰ درصد کاهش رشد داشته است (۳۱). مطالعات نشان داده‌اند که مورفین می تواند رشد کارسینوم سلول کلیوی را با افزایش بیان بازدارنده آپوپتوز (Survivin)، تحریک کند (۳۸). گیرنده‌های اندوکانابینوئیدی به دو زیر گروه نوع ۱ (CB1) و نوع ۲ (CB2) تقسیم می‌شوند (۱۳). برخی مطالعات نشان داده‌اند که گیرنده‌های اندوکانابینوئیدی در اثرات ضددردی تجویز مکرر مورفین در حیوانات دخالت دارند (۴۱). اندوکانابینوئیدها به طور عمده با افزایش آپوپتوز و اتوفاژی از طریق تجمع اسفنگولیپید و هدف قرار دادن پروتئین p8 پیشرفت سرطان را کاهش می‌دهند (۱۰). آنها همچنین رگزایی را مهار نموده و دارای خواص تعدیل کننده ایمنی هستند (۳۹). مشخص شده است که فعال شدن گیرنده‌های اندوکانابینوئیدی نوع یک رشد تومور را مهار نموده و با مهار این گیرنده‌ها

توسط AM251 اثر ضد توموری آن دیده نمی‌شود (۳۰). فسفولیپازC (PLC) آنزیمی است که هیدرولیز فسفاتیدیل کولین را برای تولید دی آسیل گلیسرول و اینوزیتول تری فسفات کاتالیز می‌کند. این آنزیم در انواع فرآیندهای سلولی از جمله رشد سلولی، تکثیر و مهاجرت نقش دارد. سلول‌های سرطانی اغلب فعالیت PLC را افزایش می‌دهند که می‌تواند به پتانسیل تومورزایی و متاستاتیک آنها کمک کند (۲۱). با توجه به اینکه مورفین برای تسکین درد سرطان در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته بطور گسترده استفاده می‌شود، تاکنون اثر آن بر روی سلول‌های سرطان مری YM1 مورد مطالعه قرار نگرفته و مکانیسم اثر آن مشخص نشده است. در این مطالعه ضمن بررسی اثر مورفین و نالوکسان (مهار کننده گیرنده‌های μ) بر تکثیر رده سلول‌های سرطان مری YM1، اثر سینرژیک آن با AM251 (مهار کننده گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی نوع یک)، U23177 (مهار کننده فسفولیپاز C) و پرگابالین (مهار کننده کانالهای کلسیمی) مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه بینش‌های ارزشمندی را در مورد کاربردهای درمانی بالقوه مورفین و داروهای مورد بررسی در زمینه سرطان مری ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

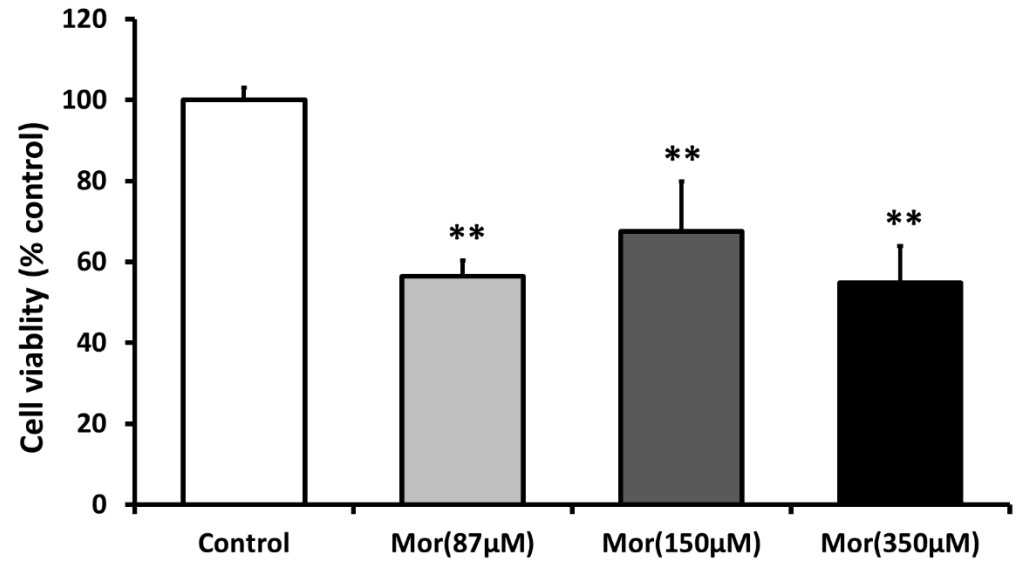
کشت رده سلولی سرطان مری YM1: به منظور ارزیابی اثرات ضد سرطانی مورفین و سایر داروها از رده سلولی سرطانی مری YM1 استفاده گردید. این رده از سلول‌های اپیتلیال کارسینوم سلول سنگفرشی مری انسان به دست آمده است. رده YM1 یک رده سلولی اپیتلیال است که از بافت تومور بیمار زن ایرانی ۵۹ ساله گرفته شده است. این رده سلولی طی ۴۰ ساعت دوبرابر می‌شود و مشخصات آن به خوبی معین شده است (Ayyoob et al. 2016). برای کشت این رده‌ی سلولی از محیط کشت RPMI 1640 حاوی۱۰ درصد FBS همراه با آنتی‌بیوتیک پنیسیلین-استرپتومایسین (سیگما) ۱درصد استفاده شد و سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با مقدار ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. پس از بررسی روزانه وضعیت رشد سلول‌ها، در صورت نیاز محیط کشت ۲-۳ بار در هفته تعویض گردید. سلول‌های رده سلولی YM1 با نسبت ۱:۳ و غلظت ۰/۲۵ درصد تریپسین EDTA در یک میلی‌مولار پاساژ داده شدند پس از شمارش سلول‌های YM1با استفاده از لام نئوبار، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در ظروف ۹۶ خانه‌ای کشت گردید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میزان ۵ درصد CO_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. حجم محیط کشت اضافه شده به هر چاهک ۰/۱ میلی لیتر بود. پس از اینکه که تراکم آنها به ۷۰ درصد رسید مورفین (داروسازی سبحان) با غلظت‌های ۸۷، ۱۷۵ و ۳۵۰ میکرومولار (۱۶)، نالوکسان (توکریس- انگلستان) با غلظت ۶۰ میکرومولار (۵)، U23177 (توکریس- انگلستان) با غلظت ۱ میلی‌مولار (۳۲)، Am251 (توکریس- انگلستان) با غلظت ۱۴۰ میکرومولار (۹) و پرگابالین (کوپران- هند) با غلظت ۶ mM (۱۲) به چاهک حاوی سلول‌ها اضافه گردید. غلظت داروها بر اساس مقالات و آزمایشات پایلوت انتخاب شدند. برای اندازه‌گیری توان‌حیاتی سلول و تأثیر داروها بر تکثیر رده سلولیYM1، از آزمایش MTT در فاصله زمانی ۲۴ ساعت استفاده شد. به این منظور۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (کیا زیست) به هریک از چاهک‌ها افزوده و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محلول رویی هر یک از چاهک‌ها دور ریخته شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیترDMSO به آنها افزوده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Awareness، امریکا) در طول‌موج۵۴۰ نانومتر

میزان جذب چاهک‌ها اندازه‌گیری و زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به کنترل محاسبه شد.

تحلیل آماری: بعد از تست نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov test مقایسه گروه‌های آزمایشی توسط آزمون One way ANOVA و آزمون تعقیبی LSD با استفاده از نرم-افزار SPSS (آخرین نسخه) انجام شد. نتایج متغیرهای کمی به صورت Mean ± SE نشان داده شده است.

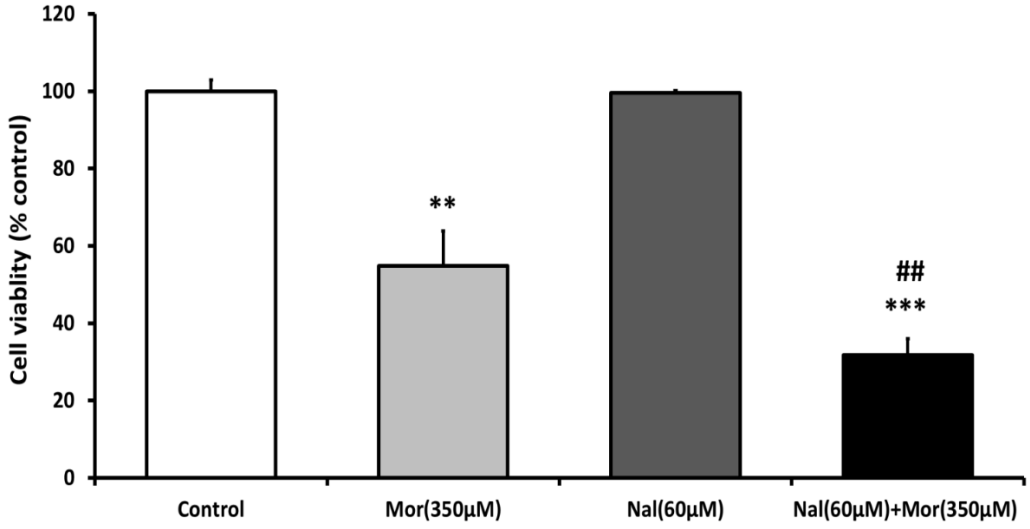
نتایج

بررسی‌های انجام شده توسط آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۱$). برررسی دو به دو گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی LSD نشان داد که افزایش مورفین به محیط کشت می‌تواند در هر سه دوز (شکل ۱) میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری کاهش دهد ($p < ۰/۰۵$). افزودن نالوکسان به محیط کشت نتوانست (شکل ۲) میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری تغییر دهد. اما نالوکسان به همراه مورفین میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) و گروه نالوکسان کاهش داد ($p < ۰/۰۲$). به همین علت احتمال می‌رود که مورفین اثر خود را از طریق مکانیزم‌های دیگر غیر از گیرنده های اوپیوئیدی μ اعمال می‌کند (شکل ۲). همچنین مقایسه آماری نشان داد که مهار انزیم فسفولیپاز C باعث کاهش معنی‌داری در بقای سلول‌های سرطانی مری می‌گردد (شکل ۳). زمانی که مهار کننده فسفولیپاز C به همراه مورفین به محیط کشت اضافه شد، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (p ۰/۰۰۱ >) کاهش داد اما تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده U23177 مشاهده نشد. بنابر این مورفین نتوانست اثر ضدسرطانی فسفولیپاز C را تشدید نماید (شکل ۳). در آزمایش بعدی به بررسی اثر مسدود شدن گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی نوع یک توسط Am251 پرداختیم (شکل ٤). نتایج آماری نشان داد که به کار بردن Am251 می‌تواند بقای سلول‌های مری سرطانی مری را به کاهش دهد ($p < ۰/۰۵$). اضافه کردن همزمان مورفین و Am251 به محیط کشت، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش داد اما تفاوت معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده Am251 مشاهده نشد (شکل ٤). همچنین در آزمایش بعدی اثر پرگابالین (مهار کننده کانال‌های کلسیمی) بررسی گردید (شکل ۵). نتایج آماری نشان داد که پر-گابالین باعث کاهش بقای سلول‌های سرطانی می‌گردد ($p < ۰/۰۵$). زمانی که مرفین همراه با پرگابالین استفاده شد بقا سلول‌های سرطانی مری را نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) و نسبت گروه مرفین کاهش داد ($p < ۰/۰۱$). در آزمایش بعدی گروهی در معرض هر سه ترکیب مورفین، مهارکننده گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی و مهار کننده فسفولیپاز C قرار گرفت (شکل ٦). اضافه کردن همزمان مورفین و Am251 به محیط کشت، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش داد. زمانی که مهار کننده فسفولیپاز C به همراه مورفین به محیط کشت اضافه شد، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش داد. نتایج نشان داد که افزایش هر سه ترکیب مورفین، مهارکننده گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی و مهار کننده فسفولیپاز C به محیط کشت، بقای سلول‌های سرطانی مری را نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۰۱$) کاهش می‌دهد. اما تفاوت معنی‌داری بین سایرگروه‌ها مشاهده نشد (شکل ٦).



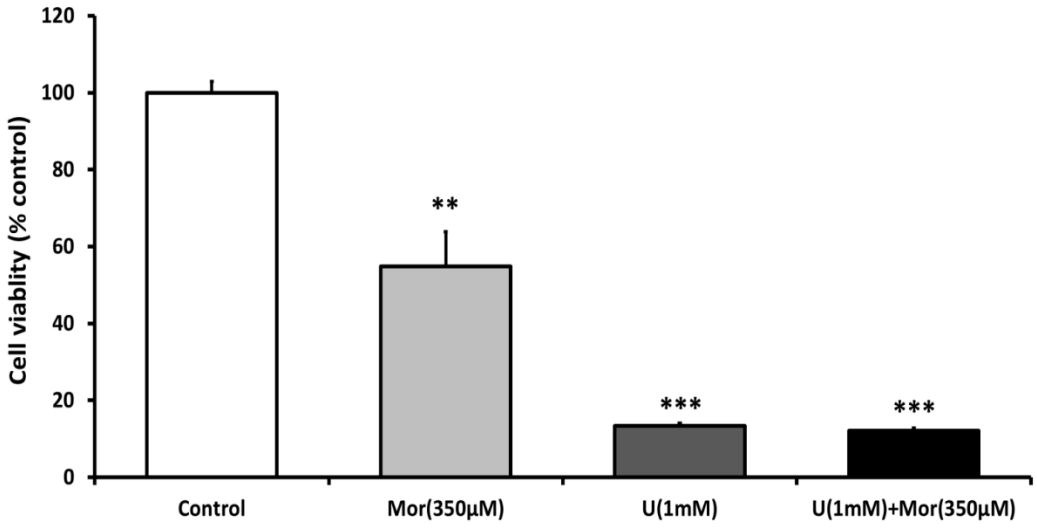
شکل ۱- بررسی اثر دوزهای مختلف مورفین (Mor) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری رده YM1: مورفین در هر سه دوز زنده ماندن سلول‌های سرطانی را کاهش داد.

Fig 1. Examining the effect of different doses of morphine (Mor) on the survival of YM1 esophageal cancer cells: Morphine in all three doses reduced the survival of cancer cells. One-way ANOVA, LSD post hoc, ** P<0.01 compared with control group.



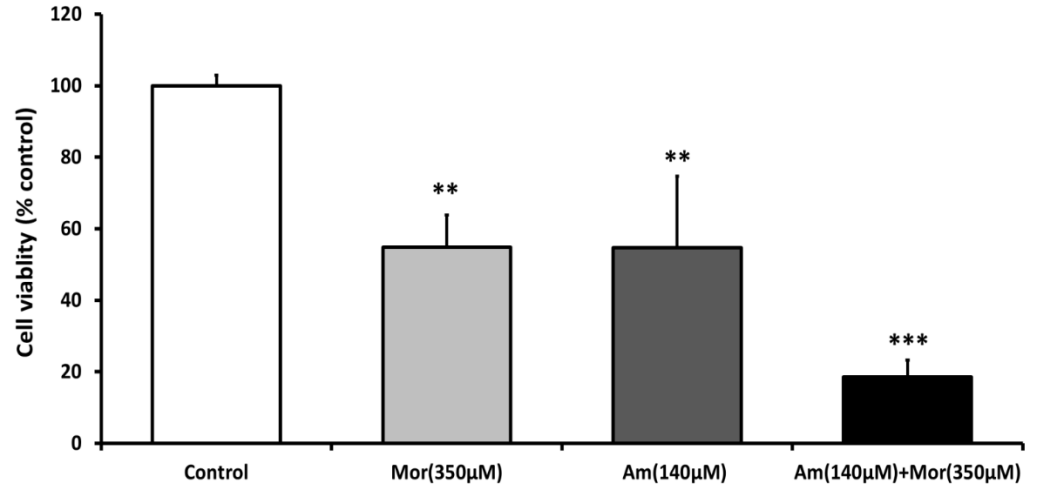
شکل ۲- بررسی اثر مورفین (Mor) و نالوکسان (Nal) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری رده YM1: مورفین زنده ماندن سلول‌های سرطانی را کاهش داد اما نالوکسان نتوانست اثر آن را خنثی کند. بنابراین، بنظر می‌رسد این اثر مورفین مستقل از گیرنده‌های μ می‌باشد

Fig 2. Examining the effect of morphine (Mor) and naloxone (Nal) on the survival of YM1 esophageal cancer cells: Morphine reduced the survival of cancer cells, but naloxone could not neutralize its effect. Therefore, it seems that this effect of morphine is independent of μ receptors. One-way ANOVA, LSD post hoc, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control group.



شکل ۳- بررسی اثر مورفین (Mor) و U73122 (U) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری رده YM1: مورفین و مهارکننده PLC (U73122) زنده ماندن سلول‌های سرطانی را کاهش داد. زمانی که مهار کننده فسفو لیپاز C به همراه مورفین به محیط کشت اضافه شد، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد اما تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده U23177 مشاهده نشد

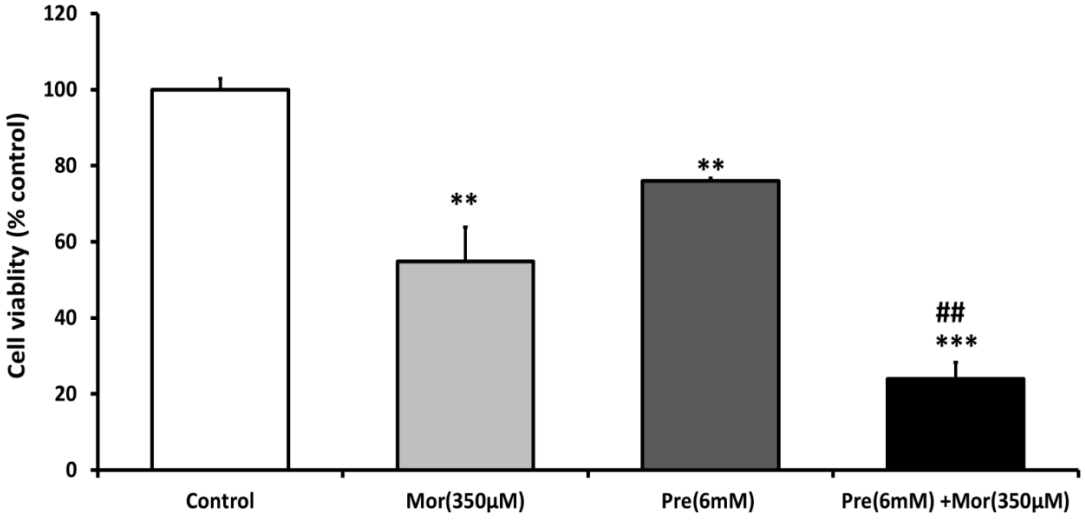
Fig 3. Investigating the effect of morphine (Mor) and U73122(U) on the survival of YM1 esophageal cancer cells: morphine and PLC inhibitor (U73122) decreased the survival of cancer cells. When the phospholipase C inhibitor was added to the culture medium with morphine, it significantly reduced the survival rate of esophageal cancer cells compared to the control group, but no significant difference was observed with the group receiving U23177. One-way ANOVA, LSD post hoc, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with contrl group and # $p < 0.05$ compared with Mor 350 µM group.



شکل ٤- بررسی اثر مورفین (Mor) و Am251 (Am) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری رده YM1: مورفین و مهارکننده گیرنده‌های اندوکانابینوئیدی نوع یک (Am251) زنده ماندن سلول‌های سرطانی را کاهش داد. اضافه کردن همزمان مورفین و Am251 به محیط کشت، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد اما تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده Am251 مشاهده نشد. بنظر می‌رسد که مهارگیرنده‌های اندوکانابینوئیدی نوع یک اثر مورفین را تشدید نمی‌کند

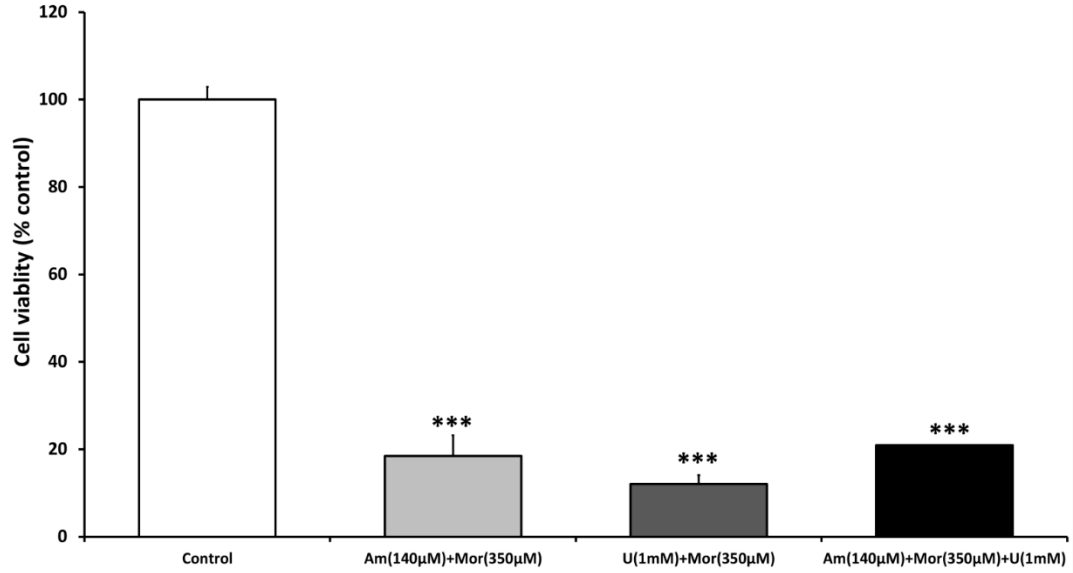
Fig 4. Examining the effect of morphine (Mor) and Am251 (Am) on the survival of YM1 esophageal cancer cells: morphine and type 1 endocannabinoid receptor inhibitor (Am251) decreased the survival of cancer cells. The simultaneous addition of morphine and Am251 to the culture medium significantly reduced the survival rate of esophageal cancer cells compared to the control group, but no significant

difference was observed with the group receiving Am251. It seems that endocannabinoid type 1 inhibitors do not intensify the effect of morphine. One-way ANOVA, LSD post hoc, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control group.



شکل ۵- بررسی اثر مورفین (Mor) و پرگابالین (Pre) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری رده YM1: مورفین و مهارکننده آنتاگونیست کانال های +Ca2 (Pre) زنده ماندن سلول‌های سرطانی را کاهش داد. زمانی که مرفین همراه با پرگابالین استفاده شد بقا سلول‌های سرطانی تشدید گردید

Fig5. Examining the effect of morphine (Mor) and pregabalin (Pre) on the survival of YM1 esophageal cancer cells: morphine and Ca2 + channel antagonist inhibitor (Pre) decreased the survival of cancer cells. When morphine was used together with pregabalin, the survival of cancer cells was intensified. One-way ANOVA, LSD post hoc, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control group and ## $p < 0.01$ compared with Mor 350 µM group.



شکل ٦- بررسی اثر مورفین (Mor)، AM251 (Am) و U73122 (U) بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری رده YM1: ترکیب مورفین با مهارکننده گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی نوع یک (AM251) و یا مهارکننده PLC زنده ماندن سلول‌های سرطانی را کاهش داد

Fig 6. Examining the effect of morphine (Mor), AM251 (Am) and U73122 (U) on the survival of YM1 esophageal cancer cells: the combination of morphine with an inhibitor of endocannabinoid receptors type

1 (AM251) or a PLC inhibitor reduced the survival of cancer cells. One-way ANOVA, LSD post hoc, *** $p < 0.001$ compared with control group.

بحث

علیرغم پیشرفت‌های مداوم در تشخیص و مدیریت سرطان، بیماران مبتلا به سرطان مری به دلیل مقاومت مداوم دارویی، عوارض جانبی شدید و استرس ناشی از درد، هنوز عمدتاً غیرقابل درمان هستند. بنابراین، جستجوی دارویی برای کنترل درد و رشد این نوع سرطان، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. مورفین در اکثر بیماران سرطانی برای تسکین درد سرطان بکار می‌رود. علاوه بر این، یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که مورفین ممکن است اثرات مفیدی غیر از اثر ضد درد داشته باشد. با این حال، مکانیسم اثر آن به وضوح درک نشده است. مطالعه کنونی ما شواهدی را ارائه می‌کند که نشان می‌دهد درمان با مورفین می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطانی مری رده YM1 را مهار کند. مطابق با یافته‌های ما، گزارش شده است که ترکیب ۵-فلوراوراسیل و مورفین با فعال کردن آبشار سیگنال آپوپتوز، به طور موثر زنده ماندن سلول‌های MCF-7 را سرکوب می‌کند (۱۷). علاوه بر این، تعداد فزاینده‌ای از شواهد وجود دارند که نشان می‌دهند مورفین شبکه سیگنالینگ مولکولی را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. متالوپروتئینازهای ماتریکس یک کلاس از آنزیم‌های پروتئولیتیک هستند و می‌توانند تخریب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی را تحریک کنند. افزایش فعالیت متالوپروتئینازهای ماتریکس در طیف گسترده ای از سرطان ها شناسایی شده است و به نظر می رسد با پتانسیل تهاجمی و متاستاتیک آنها مرتبط باشد. گچ و همکارانش دریافتند که مورفین در سلول‌های MCF-7 با کاهش بیان متالوپروتئینازهای ماتریکس نوع ۲ و ۹ رشد و تکثیر سلول‌های تومور پستان را مهار می‌کند (۱۵). همچنین، مورفین با مسدود کردن β-آرستین-۲ از طریق مهار مسیر کاسپاز-۸ باعث مرگ آپوپتوتیک قابل‌توجهی در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB231 می‌گردد (۴۲). نالوکسان آنتاگونیست گیرنده‌های μ، نتوانست اثر ضد تکثیر مورفین را معکوس کند. بنابراین، بنظر می‌رسد این اثر مورفین مستقل از گیرنده‌های μ می‌باشد. در بخش دیگر از این مطالعه، رابطه بین مهارPLC و بقای سلول‌های سرطانی مری رده YM1 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که مهار فسفولیپاز C باعث کاهش شدیدی در بقای سلول‌های سرطانی مری می‌گردد. زمانی که مهار کننده فسفولیپاز C به همراه مورفین ۳۵۰ μM به محیط کشت اضافه شد، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را نسبت به گروه کنترل کاهش داد اما تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده U23177 مشاهده نشد. بنابر این مورفین نتوانست اثر ضدسرطانی فسفولیپاز C را تشدید نماید. بنابر این احتمال می‌رود مورفین نیز از طریق مهار فسفولیپاز C اثر خود را اعمال می‌کند. شواهدی که حاکی از ارتباط بین PLC و سرطان است، امکان ایجاد درمان هدفمند برای سرطان را پیشنهاد کرده است. آنزیم PLC انتقال از G0/G1 به فاز چرخه سلولی S/G2/M را تحریک می‌کند، که در پیشرفت سرطان و تغییرات مربوط به اسکلت سلولی که در طول تقسیم سلولی، تحرک و تهاجم تومور رخ می‌دهد، مهم است (٤). برخی از مطالعات تغییر سطح بیان PLC را در سلول‌های تومور پستان نشان داده‌اند. به عنوان مثال، در سلول‌های تومور پستان بیان بیش از حد PLC، تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد (۲۵). از طرف دیگر، کاهش بیان PLC به شدت تهاجم سلولی در سرطان سینه، گلیوبلاستوما و رده‌های سلولی سرطان سر و گردن را مختل می‌کند (۲۱). مطالعه

حاضر قادر به ارائه جزئیات بیشتر از پیوند بین PLC و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن نبود و مطالعات آینده باید به این نکات بپردازد. اما مشاهدات نشان می‌دهد که مهار PLC ممکن است از اهداف درمانی بالقوه در سرطان مری باشد. بیماران سرطان سینه با سطوح بیان بالای PLC دوره بقای کوتاه‌تری را تجربه می‌کنند و این نتیجه ممکن است نشان دهنده ارتباط بین PLC و عود در بیماران سرطان پستان باشد (۷). مطابق با نتایج ما، نشان داده شده است که مهارکننده‌های PLC عملکرد سلولی با واسطه PLC را در سلول‌های سرطانی مهار می‌کنند. به عنوان مثال، مهارPLC با داروی U73122، مهاجرت سلولی و تهاجم سلولی را درسلول‌های سرطانی پستانی را کم کرده و کاهش رشد تومور را سبب می‌گردد (۷). با کاهش بیان PLC، توانایی تومورزایی سلول‌های سرطانی سنگفرشی مری هم در آزمایش‌های برون‌تنی و هم درون‌تنی سرکوب می‌شود. پیشنهاد شده است که PLC نقش مهمی در متاستاز سلول سنگفرشی مری داشته باشد زیرا نشان داده شده است که کم شدن آن باعث کاهش تحرک سلولی و افزایش چسبندگی سلولی می‌شود (۱٤). در بخش بعدی تحقیق، نتایج نشان داد که مهار گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی نوع یک توسط Am251 می‌تواند بقای سلول‌های مری سرطانی مری را کاهش دهد. اضافه کردن همزمان مورفین و Am251 به محیط کشت، میزان بقای سلول‌های سرطانی مری را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد اما تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده Am251 مشاهده نشد. به‌نظر می‌رسد که مهارگیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی نوع یک اثر مورفین را تشدید نمی-کند. هم راستا با این نتایج، نشان داده شده است که فعال شدن گیرنده‌های اندوکاناپینوئیدی نوع یک باعث توقف چرخه سلولی ملانوم از طریق مهار پروتئین کیناز B و هیپوفسفوریلاسیون پروتئین مرتبط با رتینوبلاستوما (Rb) می‌گردد (٦). کاهش مشابهی در زنده ماندن توسط کانابینوئیدها در سایر رده‌های سلولی ملانوسیتی گزارش نشده است (۳۵). در سلول‌های ملانوما A375، داروی Am-251 با کاهش پروتئین‌های ضد آپوپتوز مانند BCL2 و survivin باعث توقف چرخه سلولی می‌گردد (۹). در مطالعه دیگر نشان داده شده است که غیرفعال کردن گیرنده کانابینوئیدی با استفاده از shRNA ها، منجر به کند شدن چرخه سلولی در فاز G1-S می‌شود که با کاهش فعالیت پروتئین کینازB و ERK همراه است (۸). البته باید توجه کرد که اثر کانابینوئیدها بسته به غلظت و یا نوع سلول‌ها متغیر می‌باشد (۳۵). بطور مثال مشخص شده است که آگونیست‌های گیرنده کانابینوئیدی از تکثیر رده های سلولی ملانوم HT168-M1، WM35 و WM35 جلوگیری می‌کنند (۲۲). داروی پرگابالین آنتاگونیست کانال‌های Ca^{2+} بوده و به طور خاص به زیر واحد آلفا-۲-دلتا متصل می‌شود تا اثرات ضد صرع و ضد درد ایجاد کند. این دارو با موفقیت علائم انواع مختلف دردهای عصبی را کاهش می دهد و خود را به عنوان یک عامل درمانی خط اول با اثربخشی قابل توجه نشان می‌دهد. پرگابالین آنالوگ انتقال‌دهنده عصبی گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) می‌باشد (۲٦). کانال‌های Ca^{2+} به عنوان هدف امیدوارکننده در درمان سرطان مطرح شده‌اند زیرا گزارش شده است که در بسیاری از انواع سرطان تعداد آنها روبه ازدیاد می‌رود (۱۲). مطالعه‌ای که روی حیوانات ناک اوت انجام شده است نشان داده است که مهار انتخابی کانال های Ca^{2+} ممکن است بر درمان سرطان تأثیر بگذارد (۲۸). نتایج بدست آمده نشان داد که پرگابالین کاهش بقای سلول‌های سرطانی مری رده YM1 می‌شود. زمانی که مرفین همراه با پرگابالین استفاده شد بقا سلول‌های

سرطانی تشدید گردید. این نتیجه همسو با مطالعاتی است که در انها نشان داده شده است که پرگابالین می‌تواند باعث تشدید اثر ضد مورفین گردد (۲۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه، مورفین به تنهایی و یا در ترکیب با دیگر داروها توانست زنده ماندن سلول‌های سرطانی مری را کاهش دهد. به طور خاص، مورفین در سه دوز مختلف (۸۷، ۱۷۵ و ۳۵۰ µM) به طور معنی‌داری بقای سلول‌های سرطانی را کاهش داد. نالوکسان، هنگامی که با مورفین ترکیب شد، اثرات افزایش یافته‌ای را در کاهش زنده ماندن سلول نشان داد. همچنین، استفاده از مهار کننده گیرنده کانابینوئید نوع ۱ (AM251)، مهار کننده فسفولیپاز (U73122) ، هر دو به تنهایی و یا همراه با مورفین، کاهش قابل توجهی در زنده ماندن سلولی نشان دادند. پرگابالین، هنگامی که به تنهایی یا در ترکیب با مورفین استفاده گردید، کاهش قابل توجهی در زنده ماندن سلولی را نیز نشان داد. یافته ها نشان می دهد که اثرات مورفین فراتر از خواص ضد درد آن است و ممکن است پیامدهای مستقیمی برای کنترل سرطان داشته باشد. ترکیب هر سه دارو با مورفین منجر به کاهش قابل توجهی در زنده ماندن سلول شد، که نشان دهنده یک اثر افزودنی یا هم افزایی بالقوه می‌باشد. نتایج این ایده را تایید می کند که هدف قرار دادن چندین مسیر به طور همزمان می تواند یک رویکرد موثر در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی باشد. نتایج ما نشان داد که مورفین و داروهای مذکور می‌توانند به عنوان گزینه‌های موثر برای کاهش رشد سلولی در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته مری در نظر گرفته شوند. بنابر این نتایج این تحقیق مبنایی برای تحقیقات پیش بالینی و بالینی بیشتر برای بهینه‌سازی پتانسیل درمانی این ترکیبات دارویی فراهم می‌کند. به طور کلی، این مطالعه نشان می‌دهد که مورفین و داروهای مورد بررسی به عنوان درمان‌های کمکی برای سرطان مری با هدف قرار دادن تکثیر سلول‌های سرطانی نویدبخش هستند.

منابع

1. Aghababaei Ziarati A., Ghorbani H., Hosseinalizadeh M. 2012. Evaluate the Relationship between Spatial Distribution of Esophageal and Gastric Cancers and Soil Conditions at the Golestan Province [Research(Original)]. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 21(1):180-193.

2. Ajani J.A., D'Amico T.A, Bentrem D.J., Cooke D., Corvera C., Das P. Enzinger P.C., Enzler T., Farjah F., Gerdes H. 2023. Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, Version 2.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 21(4):393-422.

3. Ayyoob K., Masoud K., Vahideh K., Jahanbakhsh A. 2016. Authentication of newly established human esophageal squamous cell carcinoma cell line (YM-1) using short tandem repeat (STR) profiling method. Tumour biology : the journal of the *International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(3):3197-3204.

4. Bertagnolo V., Benedusi M, Brugnoli F., Lanuti P., Marchisio M., Querzoli P., Capitani S. 2007. Phospholipase C-beta 2 promotes mitosis and migration of human breast cancer-derived cells. *Carcinogenesis*, 28(8):1638-1645.

5. Bimonte S., Barbieri A., Cascella M., Rea D., Palma G., Del Vecchio V., Forte C.A., Del Prato F., Arra C., Cuomo A. 2018. The effects of naloxone on human breast cancer progression: in vitro and in vivo studies on MDA.MB231 cells. *OncoTargets and Therapy*, 11:185-191.

6. Blázquez C., Carracedo A., Barrado L., Real P.J., Fernández-Luna J.L., Velasco G., Malumbres M., Guzmán M. 2006. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. FASEB journal : official publication of the Federation of *American Societies for Experimental Biology*, 20(14):2633-2635.

7. Cai S., Sun P.H., Resaul J., Shi L., Jiang A., Satherley L.K., Davies E.L., Ruge F., Douglas-Jones A., Jiang W.G. 2017. Expression of phospholipase C isozymes in human breast cancer and their clinical significance. *Oncology Reports*, 37(3):1707-1715.

8. Carpi S., Fogli S., Polini B., Montagnani V., Podestà A., Breschi M.C, Romanini A., Stecca B., Nieri P. 2017. Tumor-promoting effects of cannabinoid receptor type 1 in human melanoma cells. *Toxicology in Vitro*, 40:272-279.

9. Carpi S., Fogli S., Romanini A., Pellegrino M., Adinolfi B., Podestà A., Costa B., Da Pozzo E., Martini C., Breschi M.C. 2015. AM251 induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in A375 human melanoma cells. *Anti-cancer Drugs*, 26(7):754-762.

10. Carracedo A., Lorente M., Egia A., Blázquez C, García S, Giroux V, Malicet C., Villuendas R, Gironella M, González-Feria L et al. 2006. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, 9(4):301-312.

11. Chen Y., Qin Y., Li L., Chen J., Zhang X., Xie Y. 2017. Morphine Can Inhibit the Growth of Breast Cancer MCF-7 Cells by Arresting the Cell Cycle and Inducing Apoptosis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*,. 40(10):1686-1692.

12. Daroun L.H.F. 2008. Cytotoxic effect of Pregabalin on U937 and Molt-4 Leukemic Cells in Vitro. I*ranian Journal of Blood and Cancer*, 11(1):1-5.

13. De Vry J., Jentzsch K.R.., Kuhl E, Eckel G. 2004. Behavioral effects of cannabinoids show differential sensitivity to cannabinoid receptor blockade and tolerance development. *Behavioural Pharmacology*, 15(1):1-12.

14. Fu L., Qin Y.R., Xie D., Hu L., Kwong D.L., Srivastava G., Tsao S.W., Guan X.Y. 2007. Characterization of a novel tumor-suppressor gene PLC delta 1 at 3p22 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 67(22):10720-10726.

15. Gach K., Szemraj J., Wyrębska A., Janecka A. 2011. The influence of opioids on matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion and mRNA levels in MCF-7 breast cancer cell line. *Molecular Biology Reports*, 38(2):1231-1236.

16. Gach K., Wyrębska A., Fichna J., Janecka A. 2011. The role of morphine in regulation of cancer cell growth. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 384(3):221-230.

17. Ge Z.H., Wang ZX, Yu T.L., Yang N., Sun Y., Hao C..L, Sun L.X. 2014. Morphine improved the antitumor effects on MCF-7 cells in combination with 5-Fluorouracil. *Biomedecine and Pharmacotherapie*, 68(3):299-305.

18. Gonzalez-Nunez V., Noriega-Prieto J.A., Rodríguez R.E. 2014. Morphine modulates cell proliferation through mir133b and mir128 in the neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(4):566-572.

19. Gupta K., Kshirsagar S., Chang L., Schwartz R., Law P.Y., Yee D., Hebbel R.P. 2002. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Research*, 62(15):4491-4498.

20. Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Castanas E. 1996. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the

mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *The FEBS Journal*, 276(7):2022-2036.

28. Lory P., Chemin J. 2007. Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers. *Expert opinion on therapeutic targets*, 11(5):717-722.

29. Mantyh P.W. 2006. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nature reviews Neuroscience*, 7(10):797-809.

30. Maradonna F., Fontana C.M. 2022. A zebrafish HCT116 xenograft model to predict anandamide outcomes on colorectal cancer. *Cell Death and Disease*, 13(12):1069.

31. Mathew B., Lennon F.E., Siegler J., Mirzapoiazova T., Mambetsariev N., Sammani S., Gerhold L.M., LaRiviere P.J., Chen C.T., Garcia J.G. 2011. The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory investigation. *Anesthesia and Analgesia*, 112(3):558-567.

32. Neacsu C., Sauer S.K. 2020. The phospholipase C inhibitor U73122 is a potent agonist of the polymodal transient receptor potential ankyrin type 1 (TRPA1) receptor channel. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(2):177-189.

33. Nishiwada T., Kawaraguchi Y., Uemura K., Kawaguchi M. 2019. Morphine inhibits cell viability and growth via suppression of vascular endothelial growth factor in human oral cancer HSC-3 cells. *Journal of Anesthesia,* 33(3):408-415.

34. Qin Y., Li L., Chen J., Tang X., Liao C., Xie Y., Xiao Q. 2012. Fentanyl inhibits progression of human gastric cancer MGC-803 cells by NF-kappaB downregulation and PTEN upregulation in vitro. *Oncology Research,* 20(2-3):61-69.

35. Ramer R., Wendt F., Wittig F., Schäfer M., Boeckmann L. 2022. Impact of Cannabinoid Compounds on Skin Cancer. *Cancers*, 14(7):1769.

T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors . *European Journal of Pharmacology*, 296(2):199-207.

21. Jones N.P., Katan M. 2007. Role of phospholipase Cγ1 in cell spreading requires association with a β-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Molecular and Cellular Biology*, 27(16):5790-5805.

22. Kenessey I., Bánki B., Márk Á., Varga N., Tóvári J., Ladányi A., Rásó E., Tímár J. 2012. Revisiting CB1 receptor as drug target in human melanoma. *Pathology and Oncology Research*, 18:857-866.

23. Kieffer B.L., Gavériaux-Ruff C. 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*, 66(5):285-306.

24. Koyuncu T., Oğuz G., Akben S., Nas S., Ünver S. 2013. [The effects of pregabaline on postoperative pain and opioid consumption used perioperatively in patients undergoing modified radical mastectomy]. Agri: Agri (Algoloji) Dernegi'nin Yayin organidir . *The journal of the Turkish Society of Algology*, 25(4):169-178.

25. Leung D.W, Tompkins C., Brewer J., Ball A.., Coon M, Morris V., Waggoner D., Singer J.W. 2004. Phospholipase C δ-4 overexpression upregulates ErbB1/2 expression, Erk signaling pathway, and proliferation in MCF-7 cells. *Molecular Cancer*, 3(1):1-15.

26. Li Z., Taylor C.P., Weber M., Piechan J., Prior F., Bian F., Cui M., Hoffman D., Donevan S. 2011. Pregabalin is a potent and selective ligand for α(2)δ-1 and α(2)δ-2 calcium channel subunits. *European Journal of Pharmacology*, 667(1-3):80-90.

27. Lin X., Wang Y.J., Li Q., Hou Y.Y., Hong M.H., Cao Y.L, Chi Z.Q., Liu J.G. 2009. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-

36. Sergeeva M., Grishina Z., Varfolomeyev S. 1993. Morphine effect on proliferation of normal and tumor cells of immune origin. *Immunology Letters*, 36(2):215-218.

37. Tegeder I., Grösch S., Schmidtko A., Häussler A., Schmidt H., Niederberger E., Scholich K, Geisslinger G .2003 .G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Research*, 63(8):1846-1852.

38. Tuerxun H., Cui J. 2019. The dual effect of morphine on tumor development. *Clinical and Translational Oncology*, 21(6):695-701.

39. Vecera L., Prasil P., Srovnal J., Berta E., Vidlarova M., Gabrhelik T., Kourilova P., Lovecek M. 2023. Morphine analgesia, cannabinoid receptor 2, and opioid growth factor receptor cancer tissue expression improve survival after pancreatic cancer surgery. *Cancers*, 15(16):4038.

40. Yin D, Mufson RA, Wang R, Shi Y. 1999. Fas-mediated cell death promoted by opioids. Nature. 397(6716):218-218.

41. Zhang M., Chi M., Zou H., Tian S., Zhang Z., Wang G. 2017. Effects of coadministration of low dose cannabinoid type 2 receptor agonist and morphine on vanilloid receptor 1 expression in a rat model of cancer pain. *Molecular Medicine Reports*, 16(5):7025-7031.

42. Zhao M., Zhou G., Zhang Y., Chen T., Sun X., Stuart C., Hanley G., Li J., Zhang J., Yin D. 2009. beta-arrestin2 inhibits opioid-induced breast cancer cell death through Akt and caspase-8 pathways. *Neoplasma*, 56(2):108-113.