

اثر معکوس فنوفیبرات بر مقاومت چند دارویی میانجی‌گری شده توسط P-glycoprotein، از طریق افزایش بیان PTEN وابسته به PPAR γ در سلول‌های سرطان کولورکتال SW-480

بهمن یوسفی^۱، امیر ولیزاده^۲، مهران مولاوند^۳، مریم مجیدی نیا^۴*

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۶/۱۹ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۷/۲۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مقاومت چند دارویی یک چالش عمده در درمان سرطان است. این مطالعه به بررسی نقش و مکانیسم‌های بالقوه گیرنده‌های پرولیفراسیون پرکسیزومی فعال‌شونده توسط گاما (PPAR γ) در سلول‌های سرطان کولون مقاوم به ۵-FU (SW480/5-FU) پرداخت. **مواد و روش کار:** سلول‌های SW480 و SW480/5-FU ($10^4 \times 2$ سلول/چاهک) با غلظت‌های مختلف ۵-FU (0.01-100 μ M) و فنوفیبرات (۱-۲۵ μ M) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. زنده‌مانی سلولی با آزمون MTT ارزیابی شد. تجمع Rh123 (5 μ M) طی ۳۰-۱۲۰ دقیقه برای بررسی فعالیت P-gp و MRP-1 اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها با RT-PCR و وسترن بلات ارزیابی شدند. **یافته‌ها:** فنوفیبرات (۱۰ μ M) سمیت سلولی ۵-FU را به‌طور معناداری افزایش داد ($P < 0.05$) و IC50 را از ۳۰ μ M به ۱۰ μ M کاهش داد. فنوفیبرات بیان و فعالیت P-gp را در سلول‌های SW480/5-FU به میزان ۴۰ درصد کاهش داد ($P < 0.01$) و تجمع درون‌سلولی ۵-FU را ۲.۵ برابر افزایش داد. بیان PTEN پس از تیمار با فنوفیبرات به‌صورت وابسته به ۳ PPAR γ برابر افزایش یافت ($P < 0.001$). **بحث و نتیجه‌گیری:** فنوفیبرات از طریق افزایش بیان PTEN و مهار مسیر PI3K/Akt، مقاومت چند دارویی را در سلول‌های سرطان کولورکتال معکوس می‌کند. این مطالعه هدف قرار دادن PPAR γ را به‌عنوان یک رویکرد مؤثر برای غلبه بر مقاومت چند دارویی در شیمی‌درمانی سرطان مطرح می‌کند. **کلیدواژه‌ها:** مقاومت دارویی، سرطان کولورکتال، فنوفیبرات، PPAR γ ، PTEN، P-glycoprotein، آپوپتوز، PI3K/Akt.

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره ششم، ص ۴۷۸-۴۷۷، شهریور ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، خیابان شفا، پژوهشکده پزشکی سلولی و کاربردی، ۰۹۱۴۱۹۰۰۸۹۷

Email: majidinia25@gmail.com

مقدمه

سرطان را تنظیم می‌کنند، مرتبط است (۱، ۲). پروتئین P-glycoprotein (P-gp)، که توسط ژن MDR-1 کد می‌شود، و پروتئین مقاومت چند دارویی-۱ (MRP-1)، که توسط ژن ABCC1 کد می‌شود، اعضای اصلی انتقال‌دهنده‌های ABC در سرطان کولون هستند و می‌توانند سمیت طیف گسترده‌ای از داروهای شیمی‌درمانی را برای سلول سرطانی قابل‌تحمل بکنند. بنابراین، مهار P-gp و MRP-1 به‌عنوان یک استراتژی معقول برای غلبه بر مقاومت دارویی در سرطان کولون محسوب می‌شود (۳). انواع مختلفی از مهارکننده‌های P-gp یا MRP-1، مانند وراپامیل و سیکلوسپورین A، با عوامل ضدسرطانی ترکیب شده‌اند تا مقاومت

شیمی‌درمانی همچنان استراتژی اصلی برای درمان سرطان است. بالی‌ن‌حال، تعداد قابل‌توجهی از بیماران، به دلیل مقاومت به شیمی‌درمانی با عود تومور مواجه هستند. بروز و پیشرفت مقاومت چند دارویی (MDR) عمده‌تأ عامل اصلی مقاومت در سلول‌های توموری محسوب می‌شود، که با افزایش تخلیه دارو منجر به جلوگیری از تجمع داخل سلولی دارو می‌شود. MDR به‌طور معمول با بیان و/یا فعالیت بیش‌ازحد انتقال‌دهنده‌های کاست (ABC) وابسته به آدنوزین تری‌فسفات (ATP)، که غلظت‌های داخل‌سلولی بسیاری از داروهای سیتوتوکسیک و درمان‌های هدفمند مولکولی

^۱ دانشیار بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۲ دانشجوی بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ دانشجوی بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ استادیار بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

چند دارویی را سرکوب کنند. اما، این ترکیبات به دلیل عوارض جانبی نامطلوب مانند سمیت قلبی، و تعاملات دارویی موفق به تأیید بالینی نشدند (۴). بنابراین، شناسایی ترکیبات مؤثر در معکوس کردن MDR با حداقل عوارض جانبی، به‌عنوان زمینه‌ی تحقیقاتی جذاب در بسیاری از آزمایشگاه‌های سراسر جهان در حال پیگیری است.

رویکردهای جدید درمان سرطان متمرکز بر هدف قرار دادن و سرکوب حد واسطه‌های مسیرهای خاصی که به ویژگی‌های بدخیم و/یا مقاومت سلول‌های سرطانی کمک می‌کنند، است. مسیر سیگنال‌دهی فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K)/Akt بسیاری از فرآیندهای مهم برای پیشرفت سرطان را تنظیم می‌کند، مانند تکثیر سلولی، بقا سلولی، رگ‌زایی و متاستاز (۵). مطالعات نشان داده‌اند که مقاومت به شیمی‌درمانی سرطان کولون با فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی PI3K/Akt مرتبط است، به‌طوری‌که مهار این مسیر سیگنال‌دهی می‌تواند مقاومت چند دارویی را معکوس کرده و سلول‌های توموری را به داروهای شیمی‌درمانی حساس‌تر کند (۶).

گیرنده‌های فعال‌شده با تکثیر پراکسی زوم (PPARs)، گیرنده‌های هسته‌ای استروئیدی هستند که فرآیندهای بیولوژیک متنوعی از جمله متابولیسم لیپید و کربوهیدرات، پیشرفت، تمایز، آپوپتوز، تبدیل نئوپلاستیک، التهاب و بازسازی را تنظیم می‌کنند (۷-۹). PPAR ها با گیرنده‌های رتینوئید X (RXRs) هترو دایمر تشکیل داده و به عناصر پاسخ‌دهنده PPAR (PPRE) که در پروموتور ژن‌های هدف قرار دارند، متصل می‌شوند تا رونویسی را تنظیم کنند (۱۰). آگونیست‌های PPAR γ نیز نشان داده شده‌اند که اثرات مفیدی در انواع مختلف سلول‌های توموری شامل سرطان‌های معده، کولون، و کبدی دارند (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که آگونیست‌های PPAR γ می‌توانند بیان پروتئین فسفاتاز و تنسین هومولوگ حذف‌شده در کروموزوم ۱۰ (PTEN) را فعال کنند. PTEN به‌عنوان یک پروتئین سرکوبگر تومور، منجر به تبدیل فسفاتیدیل‌اینوزیتول (۳،۴،۵)-تری فسفات (PIP3) به فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴،۵-بی فسفات (PIP2) می‌شود و به‌این‌ترتیب، کاهش بیان PTEN در انواع مختلف تومورهای جامد ممکن است با پیش‌آگهی بد تومور و مقاومت دارویی مرتبط باشد (۱۲).

مطالعات اخیر گزارش داده‌اند که هدف‌گیری PPAR γ ممکن است درمان کمکی مؤثری در سرطان کولون باشد. در مطالعات جدیدی که بر نقش ضد سرطانی آگونیست‌های PPAR γ معطوف هستند، مشخص شده است که آگونیست‌های PPAR γ می‌توانند با مهار فرار ایمنی سلول‌های سرطانی کولون و افزایش تحرک اتوفاژیک این سلول‌ها از پیشرفت سرطان کولون جلوگیری کنند (۱۳، ۱۴). Lin و همکاران (۱۵) نشان دادند که سطح بیان

انتقال‌دهنده‌های ABC و PTEN در سلول‌های توموری از عوامل مهم تعیین‌کننده اثربخشی درمان ترکیبی هستند و پیشنهاد کردند که وضعیت PTEN تومور باید در تحلیل‌های بالینی در نظر گرفته شود. تمام این یافته‌ها ما را به این فرضیه رساند که آگونیست‌های PPAR ممکن است با تنظیم PTEN، مقاومت دارویی (MDR) را در سلول‌های سرطانی معکوس کنند. باوجود نتایج امیدوارکننده در مورد اثرات ضد سرطانی آگونیست‌های PPAR γ ، مطالعات پیشین با محدودیت‌ها و چالش‌هایی مواجه بوده‌اند که باید موردتوجه قرار گیرند. یکی از مهم‌ترین محدودیت‌ها، تناقض در نتایج مطالعات مختلف است. برخی مطالعات اثرات ضد سرطانی قوی را گزارش کرده‌اند، درحالی‌که برخی دیگر اثرات محدود یا حتی تحریک رشد سلول‌های سرطانی را نشان داده‌اند. چالش دیگر، عوارض جانبی بالقوه آگونیست‌های PPAR γ است. برخی از این ترکیبات، مانند نیازولیدین‌دیون‌ها، با افزایش خطر مشکلات قلبی-عروقی و شکستگی استخوان همراه بوده‌اند. همچنین، نگرانی‌هایی در مورد احتمال افزایش خطر سرطان مثانه با مصرف طولانی‌مدت برخی آگونیست‌های PPAR γ وجود دارد. از سوی دیگر، مکانیسم دقیق عملکرد این ترکیبات در مهار رشد سلول‌های سرطانی و غلبه بر مقاومت دارویی هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. درک بهتر این مکانیسم‌ها می‌تواند به توسعه استراتژی‌های درمانی مؤثرتر و ایمن‌تر کمک کند (۱۸-۱۶).

در این مطالعه، هدف ما بررسی نقش PPAR γ ، به‌تنهایی و در ترکیب با درمان با ۵-فلوروراسیل (5-FU)، بر بقای سلول‌ها، آپوپتوز و معکوس‌سازی مقاومت دارویی (MDR) در سلول‌های سرطان کولون مقاوم به 5-FU (SW480/5-FU) بود. برای آزمایش این فرضیه، از فنوفیبرات به‌عنوان آگونیست PPAR γ استفاده شد. یکی از داروهای شیمی‌درمانی مورد استفاده در درمان سرطان کولون، 5-FU است که به‌عنوان سوبسترا برای P-gp و MRP-1 عمل می‌کند. به‌منظور کشف مکانیسم مولکولی کلیدی، سطوح بیان mRNA و پروتئین‌های P-gp، MRP-1 و PTEN، و همچنین فعالیت‌های P-gp و MRP-1 در حضور یا عدم حضور مختلفی از مهارکننده‌های مسیرهای سیگنال‌دهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

سلول‌های سرطان کولون انسانی (SW480) و سلول‌های سرطان کولون انسانی مقاوم به 5-FU (SW480/5-FU) از مجموعه کشت سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شدند. ترکیبات 5-FU و LY294002 (مهارکننده مسیر PI3K/Akt)، PD098059 (مهارکننده مسیر MAPK/ERK)، MAPK (کیناز MAP)، GW-9662 (آنتاگونیست PPAR γ)، وراپامیل (مهارکننده P-gp) و MK571

سلول‌ها نداشت. برای FU-۵، محدوده ۰.۰۱-۱۰۰ میکرومولار استفاده شد تا منحنی پاسخ به دوز کامل به دست آید.

زمان‌های انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر اساس سینتیک رشد سلول‌ها و زمان لازم برای مشاهده اثرات دارویی انتخاب شدند. برای بررسی تجمع Rh123، زمان‌های کوتاه‌تر (۳۰-۱۲۰ دقیقه) استفاده شد تا دینامیک سریع انتقال دارو مشخص شود.

سنجش تجمع درون‌سلولی Rh123: جهت انجام این سنجش، سلول‌های SW480 و SW480/5-FU در مرحله رشد نمایی، در چگالی 5×10^5 در میلی‌لیتر، کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در حضور یا عدم حضور ۱۰ میکرومول فنوفیبرات، در محیط کشت حاوی ۵ میکرومول Rh123 انکوبه شدند. وراپامیل و MK571، به ترتیب به‌عنوان کنترل‌های مثبت برای مهارکننده‌های P-gp و MRP-1 استفاده شدند. شدت فلورسانس میانگین درون‌سلولی (MFI) مرتبط با Rh123 با استفاده از فلوئورومتر Jasco Co) FP-6200، توکیو، ژاپن) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که دستگاه فلورومتر FP-6200 (Jasco Co) دارای دقت $\pm 2\%$ و محدوده خطای کمتر از ۵ درصد است. برای کاهش خطا، هر آزمایش حداقل ۳ بار تکرار شد و میانگین نتایج گزارش شده است. تغییرات کمتر از ۱۰ درصد در شدت فلورسانس به‌عنوان تغییر معنی‌دار در نظر گرفته نشد. تحریک توسط لیزر یون آرگون، در طول موج ۴۸۸ نانومتر صورت گرفت و فلورسانس منتشرشده از طریق فیلتر عبوری ۵۳۰ نانومتری جمع‌آوری شد.

سنجش جذب و تخلیه‌ی Rh123: در سنجش جذب Rh123، سلول‌ها در یک صفحه ۶ چاهکی با چگالی 2×10^6 سلول در هر چاهک کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با محیط حاوی ۵ میکرومول Rh123 در حضور یا عدم حضور ۱۰ میکرومول فنوفیبرات و ۱۰ میکرومول وراپامیل تیمار شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوبه شدند. در سنجش تخلیه‌ی Rh123، سلول‌های SW480/5-FU ابتدا در محیط حاوی ۵ میکرومول Rh123 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه انکوبه شدند، سپس دو بار با محیط بدون Rh123 شسته شده و بعد در حضور یا عدم حضور ۴۰ میکرومول فنوفیبرات و ۱۰ میکرومول وراپامیل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه تیمار شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA، و RT-PCR: RNA کل سلولی با استفاده از معرف AccuZol™ طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده (Bioneer، Daejeon، Daedeok-gu، کره) از سلول‌ها استخراج شد. RNA کل (۲ میکروگرم) تحت واکنش RT با استفاده از

(مهارکننده MRP-1) از شرکت Cayman، آمریکا خریداری شدند. ترکیب SF1670 (مهارکننده PTEN) از شرکت Echelon Biosciences Inc، آمریکا تهیه شد. رودامین ۱۲۳ (Rh123)، ۳- (۵،۴-دی‌متیل‌تيازول)-۲،۵-دی‌فنیل‌تترازولیوم برمید (MTT) و RNase از شرکت Sigma، آمریکا خریداری شدند. سرم جنین گاوی (FBS) و محیط کشت RPMI-1640 از شرکت Gibco، آمریکا تهیه شدند. آنتی‌بادی‌های P-gp، MRP-1 و β -actin از شرکت Abcam (کمبریج، انگلستان) دریافت شدند.

کشت سلولی: سلول‌های SW480 و SW480/5-FU در محیط کشت RPMI-1640 با افزودن ۱۰ درصد FBS، در محیطی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول‌های SW480/5-FU در حضور ۰.۵ میکرومول FU کشت داده شدند و به مدت ۲ هفته در محیط کشت بدون دارو رشد یافتند تا برای انجام آزمایش‌ها آماده شوند.

سنجش زنده‌مانی سلولی: آزمون MTT برای تجزیه‌وتحلیل زنده‌مانی سلولی مورد استفاده قرار گرفت. این روش مبتنی بر کاهش MTT زرد به فورمازان نامحلول در میتوکندری سلول‌های زنده است. به‌طور خلاصه، سلول‌های SW480 و SW480/5-FU در یک صفحه ۹۶ چاهکی در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد FBS و در چگالی 2×10^4 سلول در هر چاهک کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، غلظت‌های مختلف 5-FU با یا بدون فنوفیبرات در محیط RPMI-1640 (بدون FBS) رقیق‌شده و به هر چاهک افزوده شد. آزمایش‌ها برای هر گروه، در سه تکرار و همراه با یک شاهد (کنترل) خالی انجام شد. پس از ۴۸ ساعت تیمار، محیط کشت حذف شد و ۲۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰ درصد MTT (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت، محصول فورمازان درون‌سلولی کاهش‌یافته، از طریق تعویض ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI-1640 با همان حجم از دی‌متیل‌سولفوکسیید (DMSO)، حل شد. مقادیر جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت (State Fax, 2100, Awareness Technology Inc, Palm City, FL, USA) اندازه‌گیری شد. غلظت مهارتی (IC50) هر آزمایش محاسبه شد. علاوه بر این میزان کاهش مقاومت سلولی (RF) با تقسیم مقدار IC50 سلول‌های مقاوم تیمار شده بر مقدار IC50 در سلول‌های والدی تیمار شده، محاسبه شد.

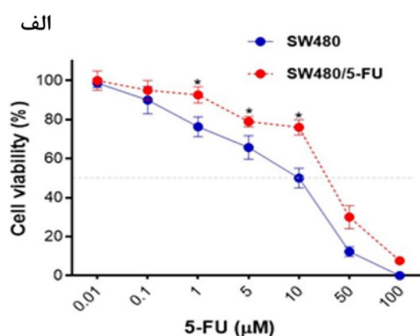
استانداردسازی روش‌ها: انتخاب غلظت‌ها: غلظت‌های فنوفیبرات و 5-FU بر اساس مطالعات قبلی و آزمایش‌های اولیه تعیین سمیت سلولی (MTT) انتخاب شدند. برای فنوفیبرات، غلظت‌های ۱-۲۵ میکرومولار استفاده شد که در این محدوده اثر سمی مستقیم بر

استاندارد (SD) ارائه شدند. تحلیل واریانس (ANOVA) به همراه آزمون‌های Sidak و Bonferroni برای تعیین تفاوت‌های معنادار بین گروه‌ها استفاده شد. مقادیر p کمتر از ۰.۰۵ به‌عنوان معنادار در نظر گرفته شدند. تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 7.04 انجام شد.

یافته‌ها

تأثیرات فنوفیبرات بر زنده‌مانی سلول‌های SW480 و SW480/5-FU: تأثیر فنوفیبرات بر زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، 5-FU (در بازه غلظتی از ۰.۰۱ تا ۱۰۰ میکرومول) سمیت سلولی مشابهی نسبت به سلول‌های MDR و سلول‌های والد مربوطه نشان داد. مقادیر IC₅₀ برای 5-FU به ترتیب ۱۰ میکرومول در سلول‌های SW480 و ۳۰ میکرومول در سلول‌های SW480/5-FU بودند، که سلول‌های SW480/5-FU نسبت به 5-FU سه برابر مقاوم‌تر از سلول‌های والد SW480 بودند.

فنوفیبرات MDR را در SW480/5-FU معکوس کرد: همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، فنوفیبرات در بازه غلظتی ۱ تا ۵ میکرومول تأثیر مهارتی بر رشد سلول‌های SW480 و SW480/5-FU نداشت، درحالی‌که اثر ضد پرولیفراتیو در غلظت‌های بالاتر مشاهده شد. برای کاهش تأثیر خود فنوفیبرات بر رشد سلول‌های مقاوم، ما در آزمایش‌های معکوس کردن MDR از غلظت پایین‌تری از مقادیر IC₅₀، یعنی ۱۰ میکرومول، استفاده کردیم. درمان با فنوفیبرات در غلظت‌های غیرسمی کاهش معناداری در مقدار IC₅₀ برای 5-FU در برابر سلول‌های SW480/5-FU ایجاد کرد (جدول ۱). بنابراین، تفاوت معنادارتر در مقدار RF (۱.۳۱) برای فنوفیبرات در سلول‌های SW480/5-FU مشاهده شد (مقدار P کمتر از ۰.۰۵).

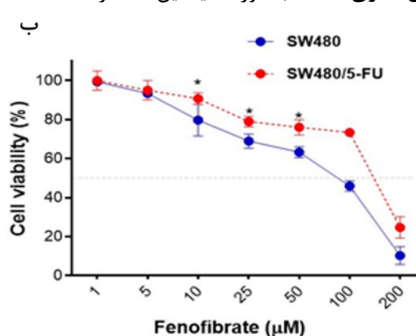


MMLV ترانس کریپتاز معکوس (Promega, Madison, WI, USA) و پرایمر oligo-Dt قرار گرفت.

سپس محصولات cDNA تحت تکثیر توسط فرایند PCR با SYBR Premix Ex Taq (Shiga, Otsu, Takara Bio, ژاپن) و پرایمرهای خاص با استفاده از سیستم Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, استرالیا) قرار گرفتند. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و برای هر نمونه‌ی آزمایش‌شده، مقدار چرخه آستانه (Ct) برای ژن هدف یا ژن β -actin تعیین شد. سطح بیان نسبی mRNA هر ژن به سطح بیان β -actin نرمال‌سازی شد که امکان محاسبه cDNA هدف به‌صورت $2^{-(Ct \text{ target gene} - Ct \beta\text{-actin})}$ را فراهم کرد.

تجزیه و تحلیل وسترن بلات: سنجش وسترن بلات انجام شد. لیزات سلولی با استفاده از بافر (۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl با 7.5 pH) حاوی شوینده‌ها (۰.۱ درصد SDS، ۱ درصد سدیم دئوکسیکولات و ۱ درصد Triton X-100) جمع‌آوری شد. غلظت پروتئین در لیزات سلولی با استفاده از معرف Bradford و آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) اندازه‌گیری شد. هر ۵۰ میکروگرم لیز بر روی ژل SDS-PAGE مربوطه با درصدهای مختلف حل شد و سپس بر روی غشاهای PVDF منتقل گردید. پس از مسدود کردن با شیر، غشاهای به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی‌های اولیه انکوبه شدند. سپس غشاهای ۳ بار با بافر TBST (Tris-buffered saline با ۰.۱ درصد Tween 20) شسته شده و با آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس غشاهای ۳ بار دیگر با بافر TBST شسته شده و با استفاده از معرف‌های ECL (Amersham Pharmacia Biotech, USA) تجزیه و تحلیل شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف



شکل (۱): حساسیت سلول‌های SW480 و SW480/5-FU به 5-FU و فنوفیبرات. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف 5-FU (الف)، و فنوفیبرات (ب)، به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT تعیین شد. هر نقطه نمایانگر میانگین $\pm$ انحراف است.

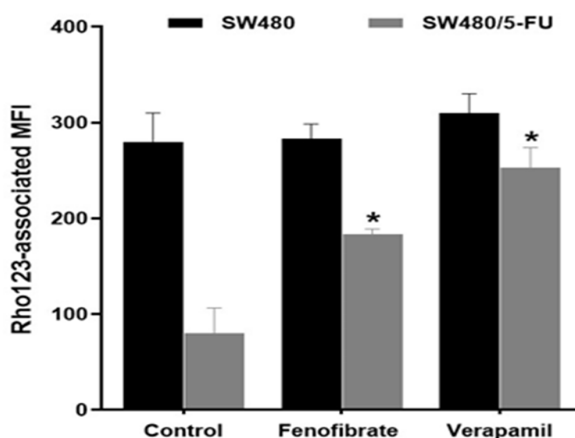
جدول (۱): تأثیر مواجهه با فنوفیبرات بر سمیت سلولی 5-FU و مواجهه همزمان با LY294002، PD098059 و SF1670 در سلول‌های SW480/5-FU و SW480

درمان	SW480/5-FU		SW480	
	IC50 (μM)	FR	IC50 (μM)	FR
(5-FU) کنترل	۰.۱۶ ± ۱۴۵	۱.۶۱	۰.۰۱۳ ± ۹۰	-
فنوفیبرات	۰.۰۸ ± ۱۱۲	۱.۲۹	۰.۰۲۳ ± ۸۵	۱.۰۵
LY294002	۰.۰۵ ± ۱۰۸	۱.۳۴	۰.۰۳ ± ۶۵۰	-
PD098059	۰.۱۶ ± ۱۰۷	۱.۲۵	۰.۰۲۱ ± ۷۸	-
SF1670	۰.۰۱ ± ۱۳۸	۱.۰۵	۰.۰۱۷ ± ۱۱	-
LY294002 + فنوفیبرات	۰.۰۳ ± ۹۹	۱.۴۶	۰.۰۰۹ ± ۱۶۸	۰.۵۳
PD098059 + فنوفیبرات	۰.۰۸ ± ۱۰۱	۱.۴۴	۰.۰۰۴ ± ۷۷	۱.۱۶
SF1670 + فنوفیبرات	۰.۱۴ ± ۱۳۳	۱.۰۹	۰.۰۱۳ ± ۷۹	۱.۱۴
وراپامیل	۰.۰۹ ± ۱۱۸	۱.۲۲	۰.۰۱۷ ± ۸۳	۱.۰۸
MK 571	۰.۰۸ ± ۱۳۵	۱.۰۷	۰.۰۰۸ ± ۸۴	۱.۰۷

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، در مطالعه جذب، پس‌از آن‌که سلول‌های SW480/5-FU با Rh123 (به‌عنوان سوبسترای P-gp و MRP-1) در حضور فنوفیبرات انکوبه شدند، MFI برای فنوفیبرات به‌طور وابسته به زمان در طول یک دوره ۲ ساعته افزایش یافت (مقدار P کمتر از ۰.۰۵) و با سلول‌های SW480/5-FU تیمار شده با وراپامیل قابل‌مقایسه بود؛ بالی‌ن‌حال، در گروه‌های دیگر، سوبسترا در همان مدت‌زمان تجمع نیافت. شکل ۳ به‌وضوح نشان می‌دهد که فنوفیبرات موجب افزایش تجمع Rh123 در سلول‌های SW480/5-FU پس از ۲ ساعت شد؛ در مقابل، چنین افزایشی در MFI در سلول‌های SW480 تحت درمان با فنوفیبرات مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که فنوفیبرات ممکن است فعالیت P-gp و/یا MRP-1 را در سلول‌های SW480/5-FU مهار کند.

سلول‌های مقاوم به مدت یک هفته قبل از کشت برای آزمایش زنده‌مانی سلول در محیط فاقد 5-FU نگهداری شدند و به روشی که در بخش روش‌ها توصیف‌شده t اندازه‌گیری شدند. هر مقدار نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار (S.D.) از سه آزمایش مستقل است. میزان مقاومت (RF) به‌عنوان نسبت مقدار IC50 سلول‌های مقاوم به مقدار IC50 سلول‌های والدین حساس متناظر تعیین شد. علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنادار در سطح $p < 0.05$ است.

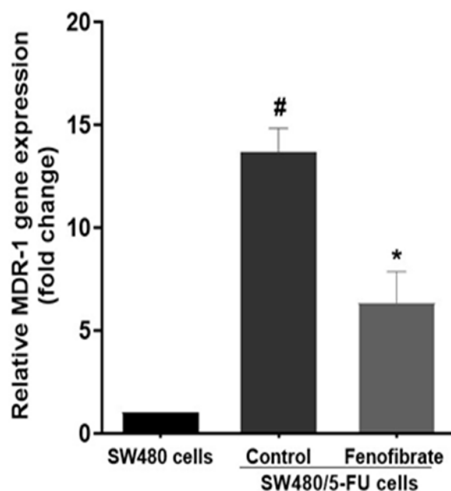
تأثیرات فنوفیبرات بر فعالیت P-gp و MRP-1: برای بررسی اینکه آیا اثرات آگونیست‌های PPAR از طریق P-gp و/یا MRP-1 میانجی‌گری می‌شوند، شدت فلورسانس میانگین (MFI) مرتبط با Rh123 در سلول‌های والد SW480 و SW480/5-FU به‌منظور تعیین سطح فعالیت P-gp و MRP-1 موردبررسی قرار گرفت. وراپامیل و MK571 به‌عنوان کنترل‌های مثبت استفاده شدند.



شکل (۲): اثر فنوفیبرات بر جذب و تجمع درون سلولی Rh123. سلول‌های SW480 و SW480/5-FU به مدت ۲ ساعت در دمای

۳۷ درجه سلسیوس با محیطی حاوی ۵ میکرومول Rh123 در حضور یا عدم حضور ۲۵ میکرومول فنوفیبرات، ۱۰ میکرومول وراپامیل و ۱۰ میکرومول MK571 انکوبه شدند و سپس، شدت فلورسانس میانگین مرتبط با Rh123 اندازه‌گیری شد. هر نقطه میانگین $\pm$ انحراف استاندارد از چهار آزمایش را نشان می‌دهد. * $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل.

به غلظت فنوفیبرات بر MFI مرتبط با Rh123 در سلول‌های SW480/5-FU مشاهده شد؛ اثر فنوفیبرات در سلول‌های SW480 معنی‌دار نبود. بالی‌ن‌حال، اثر ۲۵ میکرومول فنوفیبرات در سلول‌های SW480/5-FU تحت تیمار هم‌زمان با ۱۰ میکرومول SF1670، کاهش نشان داد. علاوه بر این، مهار فعالیت MRP-1 توسط ۱۰ میکرومول MK571، که یک مهارکننده خاص فعالیت MRP-1 است، نشان داد که MRP-1 در مقاومت به 5-FU در سلول‌های SW480/5-FU نقشی ندارد.



شکل (۴): تأثیر فنوفیبرات بر بیان MDR-1 در

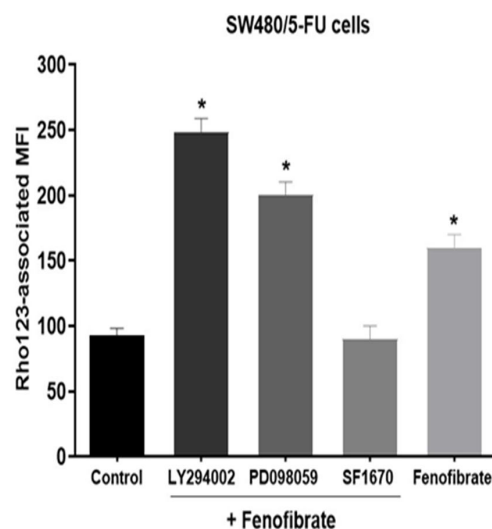
سلول‌های SW480/5-FU. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (n = 3) نمایش داده شده‌اند؛ # $p < 0.05$ در مقایسه با سلول‌های والدین SW480 و * $p < 0.05$ در مقایسه با سلول‌های SW480/5-FU بدون درمان.

فنوفیبرات با افزایش بیان PTEN، بیان P-gp را به صورت وابسته به PPAR γ در سلول‌های SW480/5-FU کاهش داد:

PTEN پروتئین سرکوبگر تومور است که با مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt، موجب القای مرگ سلولی و اثر معکوس‌کننده MDR می‌شود. این فرآیند در نهایی‌ت به کاهش بیان P-gp و افزایش تجمع درون‌سلولی دارو منجر می‌شود. برای ارزیابی رابطه بین فنوفیبرات و PTEN، بیان PTEN در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به طور غیرمنتظره‌ای، ما متوجه شدیم که بیان PTEN در سلول‌های SW480/5-FU به طور قابل توجهی کمتر است (شکل ۵). یافته‌ها به وضوح نشان دادند که فنوفیبرات پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، بیان PTEN را به طور وابسته به دوز افزایش داده است.

اثر فنوفیبرات بر MDR در حضور LY294002، PD098059 و SF1670:

برای بررسی بیشتر مکانیسم‌های مولکولی پایه‌ای، اثر معکوس‌کننده MDR فنوفیبرات را در غلظت ۱۰ میکرومولار و همچنین در حضور مهارکننده‌های خاص PI3K (LY294002)، MAPK (PD098059) و PTEN (SF1670) بررسی کردیم. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، در مقایسه با گروه کنترل، سمیت سلولی 5-FU در گروه تحت درمان با فنوفیبرات افزایش یافت. مقادیر IC50 (میکرومولار) از 145 ± 0.18 به 0.08 ± 112 کاهش یافت. بالی‌ن‌حال، اثر فنوفیبرات به طور قابل توجهی تحت درمان با SF1670 تضعیف شد (شکل ۳).



شکل (۳): تأثیر LY294002، PD098059 و SF1670 بر

افزایش تجمع داخل سلولی Rh123 توسط فنوفیبرات در سلول‌های SW480 و SW480/5-FU. پس از ۲ ساعت انکوباسیون، فنوفیبرات به طور وابسته به غلظت، MFI مرتبط با Rh123 را در سلول‌های SW480/5-FU افزایش داد، اما در سلول‌های SW480 تأثیری نداشت. درمان هم‌زمان با ۱۰ میکرومولار LY294002 یا PD098059، MFI مرتبط با Rh123 را افزایش داد و ۱۰ میکرومولار SF1670 تقریباً اثر فنوفیبرات را از بین برد. هر ستون نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار (n = 4) است و مطابق با «بخش ۲» اندازه‌گیری شده است. توجه: * $p < 0.05$ در مقابل کنترل.

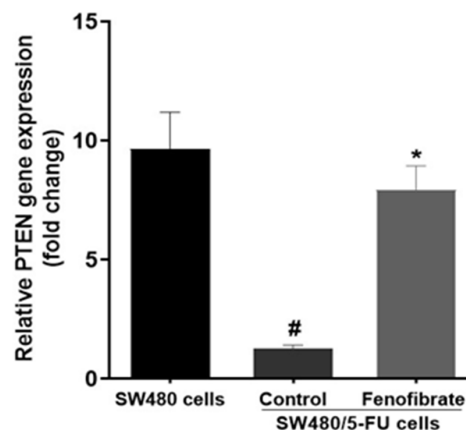
مهار PTEN، اثرات فنوفیبرات بر عملکرد P-gp را سرکوب

کرد؛ همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، پس از انکوباسیون سلول‌ها با فنوفیبرات به مدت حدود ۲ ساعت، اثر وابسته

مطالعه حاضر نشان داد که فنوفیبرات به‌طور قابل‌توجهی بقا و زنده‌مانی سلول‌های SW480/5-FU را کاهش می‌دهد. همچنین، فنوفیبرات با کاهش بیان P-gp و از بین بردن مقاومت چند دارویی (MDR) در سلول‌های سرطانی کولون، تأثیرات مثبتی نشان داد. نتایج ما حاکی از آن است که مواجهه سلول‌های مقاوم با غلظت‌های مختلف فنوفیبرات می‌تواند MDR را با افزایش تجمع درون‌سلولی FU-۵، مهار فعالیت P-gp و افزایش بیان PTEN به شکلی وابسته به PPAR γ در سلول‌های SW480/5-FU معکوس کند. تا به امروز، تنها چند مطالعه به بررسی مکانیسم‌هایی پرداخته‌اند که از طریق آن‌ها PPAR γ رشد سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند (۲۱). در یکی از این مطالعات، لین و همکارانش (۲۲) اثرات PPAR γ بر رشد سلول‌های سرطانی کولون انسان را موردبررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که فعال‌سازی PPAR γ از طریق مهار COX-2، منجر به مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز می‌شود. نتایج مطالعه ما نیز با این یافته‌ها مطابقت دارد. بالی‌ن‌حال، مکانیسم‌های درون‌سلولی مرتبط با کاهش بقا در سلول‌های مقاوم هنوز به‌طور کامل روشن نشده است.

اگرچه شیمی‌درمانی موجب افزایش قابل‌توجهی در امید به زندگی بیماران مبتلا به سرطان کولون شده است، اما درمان با عوارض جانبی خاصی همراه است (۲۳، ۲۴). به‌عنوان مثال، 5-FU با اعمال اثر نامطلوب بر سلول‌های اپی‌تلیال روده منجر به تغییر در الگوی جذب و نفوذپذیری روده‌ای می‌شود (۲۵). مشاهده‌ی سمیت قلبی به‌عنوان عارضه جانبی FU-۵ تا حد زیادی به دوز دارو وابسته است (۲۶). استفاده‌ی ترکیبی از داروهای شیمی‌درمانی با داروهای دیگر به‌عنوان یک استراتژی درمانی جدید برای کاهش عوارض جانبی کشنده موردبررسی قرار گرفته است (۲۷). در این مطالعه، نشان دادیم که ترکیب 5-FU و فنوفیبرات در غلظت‌های غیرسمی موجب کاهش قابل‌توجهی در مقادیر IC₅₀ مرتبط با 5-FU، به‌صورت وابسته به غلظت شد بنابراین، استفاده هم‌زمان از 5-FU و فنوفیبرات باعث کاهش دوز درمانی 5-FU شده و از همه مهم‌تر، ممکن است عوارض جانبی ناشی از FU-۵ را بدون کاهش اثربخشی آن کاهش دهد.

طی این مطالعه نتایج مشابهی حاصل شد. درمان با فنوفیبرات به‌طور قابل‌توجهی فعالیت و همچنین سطوح بیان mRNA/پروتئین P-gp را در سلول‌های SW480/5-FU کاهش داد. به‌عبارت‌دی‌گر، فنوفیبرات قادر به مهار خروج Rh123 از سلول‌ها است. برعکس، در حضور فنوفیبرات، تجمع 5-FU در سلول‌های مقاوم افزایش یافت که توضیح دیگری برای افزایش سمیت 5-FU در سلول‌های درمان شده با فنوفیبرات است. برای بررسی نقش فنوفیبرات در مقاومت به شیمی‌درمانی در سلول‌های SW480/5-FU، تأثیر انکوباسیون با



شکل (۵): تأثیر فنوفیبرات بر سطح بیان PTEN در

سلول‌های SW480/5-FU. فنوفیبرات سطح PTEN را در سلول‌های SW480/5-FU افزایش داد. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n = 3$) نمایش داده شده‌اند؛ $p < 0.05\#$ در مقایسه با سلول‌های والدین SW480 و $p < 0.05\#$ در مقایسه با سلول‌های SW480/5-FU بدون درمان.

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت چند دارویی (MDR) در سلول‌های توموری یکی از چالش‌های عمده در درمان سرطان به‌شمار می‌آید (۲). ازای‌ن‌رو، شناسایی ترکیبات و مکانیسم‌های مؤثر و ایمن برای معکوس کردن MDR هدفی مهم در تحقیقات بالینی محسوب می‌شود. PPAR γ به‌عنوان یکی از اعضای مهم خانواده PPAR ها که در درمان سرطان مورد مطالعه قرار گرفته است، یک هدف درمانی کلیدی برای کشف داروهای جدید به‌شمار می‌رود. تحقیقات نشان داده‌اند که لیگاند‌های PPAR γ با تحریک آپوپتوز و تنظیم بیان ژن‌ها یا پروتئین‌های مرتبط با توقف چرخه سلولی، بقای سلول‌های سرطانی را به‌طور کلی کاهش می‌دهند (۱۹، ۲۰). افزون بر این، مطالعات اخیر حاکی از آن است که فنوفیبرات، یک آگونیست PPAR γ ، ممکن است در پزشکی پیشگیرانه نقشی مؤثر ایفا کند و این اثر به‌احتمال‌زیاد وابسته به PPAR γ است (۱۱). فنوفیبرات دارویی تأیید شده FDA با پروفایل ایمنی شناخته شده است، اما نیاز به بررسی عوارض جانبی احتمالی در ترکیب با شیمی‌درمانی، همچنین نیازمند بررسی اثرات مزمن بر عملکرد کبد و کلیه و تداخلات دارویی احتمالی دارد. بیماران با سرطان کولورکتال مقاوم به FU-۵ که بیان بالای P-gp دارند، کاندیدای مناسبی هستند. لذا لزوم انجام کارآزمایی‌های بالینی فاز I و II برای تعیین دوز مؤثر و ایمن و ارزیابی اثربخشی در انسان حائز اهمیت است.

فنوفیبرات بر آپوپتوز القا شده توسط 5-FU را بررسی شد. نتایج حاکی از افزایش آپوپتوز القا شده توسط 5-FU در همراهی با فنوفیبرات بود، درحالی‌که در درمان تک‌دارویی با فنوفیبرات یا 5-FU، آپوپتوز معناداری در سلول‌های SW480/5-FU مشاهده نشد. پروتئین PTEN یکی از اعضای خانواده فسفاتازها است که دارای عملکردهای دوگانه فسفاتازی بر روی لیپیدها و پروتئین‌ها است. با توجه به اینکه PTEN به‌صورت منفی مسیر سیگنال‌دهی PI3K/Akt را تنظیم می‌کند، می‌تواند منجر به مهار تکثیر سلولی، القای آپوپتوز و تنظیم پیشرفت چرخه سلولی شود. علاوه بر این، بیان بی‌ش‌ازحد PTEN با افزایش پیری سلول‌های سرطانی در پاسخ به عوامل شیمی‌درمانی مرتبط است (۲۸-۳۰). در این راستا، P-gp به نظر می‌رسد که نقشی در افزایش کارایی شیمی‌درمانی داشته باشد. در مطالعه‌ای توسط لین و همکاران (۱۵)، گزارش شده است که کارایی درمان ترکیبی به‌طور کامل به انتقال‌دهنده‌های ABC، به‌ویژه P-gp و پروتئین مقاوم در برابر سرطان سینه (BCRP)، و همچنین به حضور PTEN و وضعیت آن در سلول‌های تومور بستگی دارد. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که ارزیابی PTEN در تومور باید در طول آزمایش‌های بالینی در نظر گرفته شود. در مطالعه‌ای دیگر، لی و همکاران (۳۱) نشان دادند که rosiglitazone فعالیت پرولیفراسیون Gefitinib را با افزایش سطوح بیان PTEN در سرطان ریه غیر کوچک سلول تقویت کرده است. با توجه به مطالعه فوق، نتایج مطالعه‌ی حاضر، به‌طور غیرمنتظره نشان داد که سطوح mRNA PTEN در سلول‌های SW480/5-FU به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر از سلول‌های والدین آن‌ها بود. علاوه بر این، دریافتیم که فنوفیبرات سطوح بیان PTEN را به‌صورت وابسته به غلظت القا کرد. علاوه بر این، فنوفیبرات P-gp را کاهش داد و سطوح بیان PTEN را در سلول‌های SW480/5-FU از طریق PPAR γ افزایش داد.

علی‌رغم یافته‌های امیدوارکننده این مطالعه، لازم است به برخی محدودیت‌ها اشاره شود. اول اینکه، این مطالعه تنها بر روی یک رده سلولی سرطان کولورکتال (SW480) و مشتق مقاوم آن (SW480/5-FU) انجام شده است. برای تعمیم‌پذیری بیشتر نتایج، لازم است این آزمایش‌ها روی رده‌های سلولی متنوع‌تری از سرطان کولورکتال و همچنین نمونه‌های بافتی اولیه انجام شود. دوم، اگرچه ما مکانیسم اثر فنوفیبرات را از طریق مسیر PPAR γ /PTEN بررسی کردیم، اما ممکن است مسیرهای سیگنالی دیگری نیز در این فرآیند دخیل باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. سوم، این مطالعه به‌صورت *in vitro* انجام شده است و برای ارزیابی اثربخشی و ایمنی این رویکرد درمانی، انجام مطالعات *in vivo* و درنهایت کارآزمایی‌های

بالینی ضروری است. چهارم، اگرچه ما نشان دادیم که ترکیب فنوفیبرات با 5-FU می‌تواند اثربخشی درمان را افزایش دهد، اما برای تعیین بهترین دوز و برنامه زمانی مصرف این ترکیب دارویی، مطالعات بیشتری موردنیاز است. درنهایت، مکانیسم دقیق تنظیم بیان PTEN توسط PPAR γ و ارتباط آن با P-gp نیاز به بررسی‌های مولکولی دقیق‌تری دارد. رفع این محدودیت‌ها در مطالعات آینده می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در معکوس‌سازی MDR و بهبود استراتژی‌های درمانی برای سرطان کولورکتال کمک کند.

به‌طورکلی، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که هدف‌گیری PPAR γ با استفاده از فنوفیبرات می‌تواند رویکرد مؤثری برای درمان ترکیبی در درمان سرطان کولون و غلبه بر MDR در برابر داروهای شیمی‌درمانی رایج باشد. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که غلبه بر MDR پس از درمان با فنوفیبرات منجر به افزایش PTEN می‌شود و مسیر سیگنال‌دهی PPAR/PTEN در فرآیند معکوس‌سازی مقاومت اعمال‌شده توسط P-gp، پس از درمان با فنوفیبرات نقش دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (شماره گرنت ۲۱۷۴)، ارومیه، ایران انجام شد.

منابع مالی:

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (شماره گرنت ۲۱۷۴)، ارومیه، ایران انجام شد.

تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافع مرتبط با نگارش و انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مؤلفان:

نویسندگان به‌صورت فعال در تمام مراحل اجرا و تحلیل نتایج مطالعه و همچنین تألیف مقاله مشارکت داشته و نسخه نهایی آن را مطالعه و تأیید می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی:

در اجرای پژوهش ملاحظات اخلاقی مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در نظر گرفته شده است، و کد اخلاق به شماره IR.UMSU.rec.1396.146 دریافت شده است.

References:

1. Sun X, Zhao P, Lin J, Chen K, Shen J. Recent advances in access to overcome cancer drug resistance by nanocarrier drug delivery system. *Cancer Drug Resist* 2023;6(2):390. <https://doi.org/10.20517/cdr.2023.16>
2. Duan C, Yu M, Xu J, Li B-Y, Zhao Y, Kankala RK. Overcoming Cancer Multi-drug Resistance (MDR): Reasons, mechanisms, nanotherapeutic solutions, and challenges. *Biomed Pharmacother* 2023;162:114643. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114643>
3. Khan SU, Fatima K, Aisha S, Malik F. Unveiling the mechanisms and challenges of cancer drug resistance. *Cell Commun Signal* 2024;22(1):109. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01302-1>
4. Fedotcheva T, Shimanovsky N. Pharmacological Strategies for Overcoming Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Pharm Chem J* 2023;56(10):1307-13. <https://doi.org/10.1007/s11094-023-02790-8>
5. Yousefi B, Samadi N, Ahmadi Y. Akt and p53R2, partners that dictate the progression and invasiveness of cancer. *DNA repair* 2014;22:24-9. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.07.001>
6. Leiphrahpam PD, Are C. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* 2024;25(6):3178. <https://doi.org/10.3390/ijms25063178>
7. Muzio G, Barrera G, Pizzimenti S. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and oxidative stress in physiological conditions and in cancer. *Antioxidants* 2021;10(11):1734. <https://doi.org/10.3390/antiox10111734>
8. Lee MY, Lee YJ, Kim YH, Lee SH, Park JH, Kim MO, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ in embryonic stem cell proliferation. *Int J Stem Cells* 2009;2:28-34. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2009.2.1.28>
9. Rostami Barandouz H, Mohammadzadeh r, Bagheri M. Study of rs4253778 polymorphism related to peroxisome proliferator alpha receptor gene in rapamycin-treated kidney transplant recipients in west Azerbaijan province (Iran). *Studies in Medical Sciences* 2024;35(1):19-29. <https://doi.org/10.61186/umj.35.1.19>
10. IJpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, et al. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 2004;23(10):2083-91. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600209>
11. Mrowka P, Glodkowska-Mrowka E. PPAR γ agonists in combination cancer therapies. *Curr Cancer Drug Targets* 2020;20(3):197-215. <https://doi.org/10.2174/1568009619666191209102015>
12. Chen M, Wang H, Cui Q, Shi J, Hou Y. Dual function of activated PPAR γ by ligands on tumor growth and immunotherapy. *Med Oncol* 2024;41(5):114. <https://doi.org/10.1007/s12032-024-02363-z>
13. Jia X, Qian J, Chen H, Liu Q, Hussain S, Jin J, et al. PPAR γ agonist pioglitazone enhances colorectal cancer immunotherapy by inducing PD-L1 autophagic degradation. *Eur J Pharmacol* 2023;950:175749. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175749>
14. Xu L, Che S, Chen H, Liu Q, Shi J, Jin J, et al. PPAR γ agonist inhibits c-Myc-mediated colorectal cancer tumor immune escape. *J Cell Biochem* 2023;124(8):1145-54. <https://doi.org/10.1002/jcb.30437>
15. Lin F, de Gooijer MC, Roig EM, Buil LC, Christner SM, Beumer JH, et al. ABCB1, ABCG2, and PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy. *Clin Cancer Res* 2014;20(10):2703-13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0084>

16. Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochem Pharmacol* 2014;92(1):73-89. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.02.012>
17. Chiarelli F, Di Marzio D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 2008;4(2):297-304. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S993>
18. Sharma V, Patial V. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its natural agonists in the treatment of kidney diseases. *Front Pharmacol* 2022;13:991059. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.991059>
19. YANG Fg, ZHANG Zw, XIN Dq, SHI Cj, WU Jp, GUO Yl, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines 1. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26(6):753-61. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00753.x>
20. Augimeri G, Giordano C, Gelsomino L, Plastina P, Barone I, Catalano S, et al. The role of PPAR γ ligands in breast cancer: from basic research to clinical studies. *Cancers* 2020;12(9):2623. <https://doi.org/10.3390/cancers12092623>
21. Zaytseva YY, Wallis NK, Southard RC, Kilgore MW. The PPAR γ antagonist T0070907 suppresses breast cancer cell proliferation and motility via both PPAR γ -dependent and-independent mechanisms. *Anticancer Res* 2011;31(3):813-23.
22. Yang W-L, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2001;22(9):1379-83. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.9.1379>
23. Masoudi N, Sadeghi S, Pashaei MR, Valizad Hasanloei MA. Evaluation of the relationship between serum levels of carcinoembryonic antigen (cea) and homeostasis model assessment of insulin resistance-2 (homa2-ir) in colorectal cancer patients. *Studies in Medical Sciences* 2022;33(3):152-9. <https://doi.org/10.52547/umj.33.3.152>
24. Herik Dizji M, Masoudi N, Rezaei S, Seyedmardani S, Pourjabali M. Osteoporosis frequency and its relationship with serum level of vitamin k2 in colon cancer patients before and after colectomy. *Studies in Medical Sciences* 2022;33(2):106-15. <https://doi.org/10.52547/umj.33.2.106>
25. Daniele B, Secondulfo M, De Vivo R, Pignata S, De Magistris L, Delrio P, et al. Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;32(3):228-30. <https://doi.org/10.1097/00004836-200303000-00009>
26. Anaka M, Abdel-Rahman O. Managing 5FU Cardiotoxicity in Colorectal Cancer Treatment. *Cancer Manag Res* 2023;14(null):273-85. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S273544>
27. Jaaks P, Coker EA, Vis DJ, Edwards O, Carpenter EF, Leto SM, et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature* 2022;603(7899):166-73. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04437-2>
28. Ortega-Molina A, Serrano M. PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24(4):184-9. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.002>
29. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011;2(3):135. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.240>
30. Fusco N, Sajjadi E, Venetis K, Gaudio G, Lopez G, Corti C, et al. PTEN alterations and their role in

- cancer management: are we making headway on precision medicine? *Genes* 2020;11(7):719. <https://doi.org/10.3390/genes11070719>
31. Lee SY, Hur GY, Jung KH, Jung HC, Lee SY, Kim JH, et al. PPAR- γ agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression. *Lung Cancer* 2006;51(3):297-301. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.10.010>

Reversal effect of fenofibrate on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance through PPAR γ -dependent upregulation of PTEN expression in SW-480 colorectal cancer cells

Bahman Yousefi¹, Amir Valizadeh², Mehran Molavand³, Maryam Majidinia^{4*}

Received: 09 September, 2024; Accepted: 20 October, 2024

Abstract

Background & Aims: Multidrug resistance is a major challenge in cancer treatment. This study investigated the role and potential mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) in 5-FU-resistant colon cancer cells (SW480/5-FU).

Materials & Methods: SW480 and SW480/5-FU cells (2x10⁴ cells/well) were treated with different concentrations of 5-FU (0.01-100 μ M) and fenofibrate (1-25 μ M) for 24, 48, and 72 hours. Cell viability was evaluated by the MTT test. The accumulation of Rh123 (5 μ M) was measured during 120-30 minutes to investigate the activity of P-gp and MRP-1. Gene expression and protein expression were evaluated by RT-PCR and western blot.

Results: Fenofibrate (10 μ M) increased the cytotoxicity of 5-FU significantly ($P < 0.05$) and decreased the IC₅₀ from 30 μ M to 10 μ M. Fenofibrate decreased the expression and activity of P-gp in SW480/5-FU cells by 40% ($P < 0.01$) and increased the intracellular accumulation of 5-FU by 2.5 times. PTEN expression increased 3-fold after fenofibrate treatment in a PPAR γ -dependent manner ($P < 0.001$).

Conclusion: Fenofibrate reverses multidrug resistance in colorectal cancer cells by increasing PTEN expression and inhibiting PI3K/Akt pathway. This study suggests targeting PPAR γ as an effective approach to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy.

Keywords: Drug resistance, Colorectal cancer, Fenofibrate, PPAR γ , PTEN, P-glycoprotein, Apoptosis, PI3K/Akt

Address: Urmia, Shefa St., Cellular and Molecular Medicine Research Institute,

Tel: 09141900897

Email: majidinia25@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(6): 478 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](#) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Associate Professor of Clinical Biochemistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Student of Clinical Biochemistry, Student Research Committee of Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Clinical biochemistry student, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Assistant Professor of Clinical Biochemistry, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
(Corresponding Author)