مقاله پژوهشی

اثرات ضد سرطانی سدیم بوتیرات بر روی رده سلولی $CaCO_2$ سرطان کولون انسانی

فلورا فروزش[۱*]، سعید طالبی[۲]، نسترن شهبازی[۳]

۱- گروه ژنتیک، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه ژنتیک پزشکی و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات زیست‌فناوری کاربردی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: سدیم بوتیرات، یک مهارکننده هیستون داستیلاز، به‌عنوان داروی ضد سرطان امیدبخشی برای بسیاری از سرطان‌ها است. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد سرطانی سدیم بوتیرات بر روی رده سلولی $CaCO_2$ سرطان کولون انسانی است.

مواد و روش‌ها: پس از کشت رده سلولی $CaCO_2$، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات (۳/۱۲۵ میلی‌مولار الی ۲۰۰ میلی‌مولار) و زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) قرار گرفتند. بررسی cytotoxicity با تست XTT انجام شد و IC_{50} تعیین گردید. آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از روش ANOVA one-way و به دنبال آن تست Tukey برای مقایسه داده‌ها انجام شد. همچنین تغییرات مورفولوژیکی با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

نتایج: سلول‌های تحت تیمار با سدیم بوتیرات در زمان‌های مختلف تفاوت بارز و وابسته به دوز را نشان دادند. cytotoxicity ماده سدیم بوتیرات در سلول‌های $CaCO_2$ سرطان کولون انسانی با استفاده از تست XTT نشان داده شد که بر طبق آن، IC_{50} این ماده برای تست ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب غلظت ۱۰۵، ۱۰۰ و ۴۳ میلی‌مولار است. نتایج بررسی مورفولوزیکی نشان داد که سدیم بوتیرات اثر مهار رشد در غلظت IC_{50} دارد و می‌تواند تقسیم سلولی را متوقف سازد.

نتیجه‌گیری: سدیم بوتیرات می‌تواند باعث مهار رشد در رده سلولی $CaCO_2$ گردد که احتمالاً با القا آپوپتوز باعث القا مرگ سلول‌ها می‌شود. این یافته‌ها می‌تواند دیدگاه‌های جالبی را در استراتژی درمان سرطان کولورکتال انسان باز کند.

کلمات کلیدی: سرطان کولورکتال، اپوپتوز، سدیم بوتیرات، مهارکننده هیستون داستیلاز، رده سلولی $CaCO_2$

مقدمه

سرطان کولورکتال (CRC) یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در دنیاست و چهارمین علت مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است. این سرطان چهارمین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان بشمار می‌رود (۱). از سوی دیگر مطالعات همه‌گیرشناسی انجام‌یافته درزمینهٔ شیوع این بیماری حاکی از رشد فزاینده آن در سالیان اخیر است. شیوع سرطان کولورکتال در مناطق جغرافیایی گوناگون متنوع بوده، به‌نحوی‌که در استرالیا، نیوزلند، انگلیس و آمریکا دارای بالاترین میزان شیوع و در کشورهای آفریقایی و آسیایی دارای کمترین نرخ شیوع است (۲). با توجه به شیوع روزافزون سرطان کولورکتال در سطح جهانی، مطالعات متعددی به‌منظور شناسایی عوامل مستعد کننده ابتلا به این بیماری انجام شده (۳) همچنین مطالعات متعددی درزمینهٔ شناسایی عوامل ژنتیکی مؤثر بر بروز این بیماری انجام یافته است. یافته‌ها حاکی از این نکته است که سرطان کولورکتال یک بیماری پلی ژنیک بوده که خطر ابتلا به آن با انواع لوکوس‌های متعدد ژنی با اندازه اثر کم تعیین می‌شود. این امر بدان معناست که هر یک از لوکوس‌های ژنی شناخته‌شده مرتبط با این بیماری تنها می‌توانند دارای یک اثر کوچک جمع شونده بر روی خطر کلی ابتلا به بیماری داشته باشند و به‌تنهایی نمی‌توانند به‌طور مستقیم منجر به بروز بیماری شوند (۴). طی مطالعات صورت گرفته مشاهده‌شده است که مکانیسم‌های اپی ژنتیکی، بیان ژن‌ها را کنترل می‌کنند. همچنین در تنظیم فرآیندهای سلولی نقش اساسی ایفا می‌کنند و ناهنجاری‌های اپی ژنتیکی منجر به غیر فعال‌سازی ژن‌های سرکوبگر تومور،

*نویسنده مسئول: **فلورا فروزش**، گروه ژنتیک، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
Email: f8forouzesh@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-2747-3479

فعال‌سازی انکوژن‌ها و ناپایداری کروموزومی را کنترل می‌کنند و نقش مهمی را در ایجاد تومور در روده بزرگ ایفا می‌نمایند (۵). فرایندهای اپی ژنتیکی در کروماتین (ازجمله DNA ژنومیک، هیستون‌ها و یا پروتئین‌های مرتبط با هیستون‌ها) شامل افزودن گروه‌های متیل، استیل، فسفوریل و یا حتی بخش‌های بزرگی مانند اتصال یوبی کوئین و یا اصلاح‌کننده‌های (modifier) شبیه یوبی کوئیتین کوچک است (۶, ۷). جدای از همه تغییرات اشاره‌شده، استیله شدن هیستون به‌طور گسترده موردمطالعه قرار گرفته است و نقش‌های گوناگونی در تنظیم نوکلئوزوم برای آن معرفی شده است. به‌عنوان‌مثال، استیله شدن لیزین می‌تواند منجر به تغییر در ساختار کروماتین گردد و ممکن است میانکنش هیستون-DNA را کاهش دهد و دسترسی به DNA را برای فعالیت رونویسی افزایش دهد (۸). فعال شدن و غیرفعال شدن غیرطبیعی رونویسی بر اساس استیله شدن هیستون‌ها ممکن است با تومورزایی همراه باشد (۹). شواهد متعددی نشان داده است که آنزیم‌های هیستون داستیلازهایی (HDACs) که با تعدادی از انکوژن‌های شناخته‌شده سلولی و ژن‌های سرکوبگر تومور در ارتباط هستند، منجر به بروز اشکال ویژه‌ای از بدخیمی‌ها می‌شوند (۱۰، ۱۱). هیستون داستیلازها می‌توانند بیان ژن‌های سرکوبگر تومور و همچنین فعالیت فاکتورهای رونویسی مرحله شروع و پیشرفت سرطان را از طریق تغییر DNA و یا اجزای ساختاری کروماتین تنظیم کنند. ازنظر بالینی، نقش سرکوب ژن از طریق مدولاسیون مانند استیله شدن در بیماران مبتلا به سرطان با چندین مهارکننده HDACs تائید شده است (۱۲). در سلول‌های یوکاریوتی ۱۸ نوع مختلف HDACs شناسایی شده است که هم در هسته و هم در سیتوپلاسم قرار دارند (۱۳، ۱۴). به نظر می‌رسد فعالیت بالینی مهارکننده‌های این آنزیم‌ها از طریق استیله شدن هیستون‌ها باعث تغییر شکل فضایی باز کروماتین و فعال شدن مجدد بالقوه ژن‌های سرکوب‌شده می‌گردد و درنتیجه موجب توقف رشد، تمایز سلولی و آپوپتوز سلول‌های توموری می‌شود (۱۵-۱۹).

مهارکننده‌های هیستون داستیلازها، بیان ژن را بدون تغییر در توالی DNA هدف تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۰). افزایش استیلاسیون هیستون منجر به فعال‌سازی رونویسی ژن‌هایی می‌شود که بیان آن‌ها سبب مهار رشد تومور می‌گردد (۲۱). یکی از این مهارکننده‌ها سدیم بوتیرات است (۲۲، ۲۳). سدیم بوتیرات نسبت به عوامل شیمی‌درمانی مانند هیدروکسی اوره در مطالعات، بیشتر مورد استفاده بالینی و تحقیقاتی قرار می‌گیرد به علت اینکه سدیم بوتیرات فاقد عوارض سایتوتوکسیک و جهش‌زایی است (۲۴). با توجه به آنکه مهارکننده‌های HDAC به‌طورجدی به‌عنوان موادی با پتانسیل شیمی‌درمانی موردتحقیق قرار گرفته‌اند و استفاده از این مواد می‌تواند امیدهای تازه‌ای در جهت درمان سرطان و اثرگذاری بر القا آپوپتوز در سلول سرطانی ایجاد کند، درنتیجه هدف از مطالعه پیش رو بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی و بازدارندگی رشد سدیم بوتیرات به‌عنوان یک مهارکننده هیستون داستیلاز در رده‌های سلولی $CaCO_2$ سرطان کولون انسانی است.

مواد و روش ها

کشت سلول

ردهٔ سلولی آدنوکارسینومای اپیتلیال روده بزرگ انسانی، $CaCO_2$ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco-انگلستان) غنی‌شده با سرم جنین گاوی (FBS)[1] ۱۰ درصد (Gibco- انگلستان) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) (Gibco-انگلستان) و پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) (Gibco- انگلستان) در انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض و سلول‌ها پاساژ گردید. برای جداکردن سلول‌های چسبنده از یکدیگر و همچنین از کف فلاسک از trypsin-EDTA(۰/۲۵٪) (Gibco– انگلستان) استفاده شد. محلول trypsin-EDTA به مونولایر سلولی اضافه گردید و به‌منظور تسریع در عملکرد آنزیم، فلاسک در انکوباتور ۳۷ °C به مدت ۵ دقیقه انکوبه گشت. سپس فلاسک از انکوباتور خارج شد و پس از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از بستر خود با مشاهده در زیر میکروسکوپ، محیط کشت حاوی FBS به فلاسک اضافه گردید تا اثر تریپسین خنثی گردد. سپس سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور g ۲۵۰ سانتریفیوژ شدند. محیط روی سلول‌ها تخلیه و محیط جدید اضافه گردید.

برای انجام آزمایش‌ها، پاساژ ۴ یا ۵ سلول‌ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی و با confluency بین ۷۵ الی ۸۰٪ بکار گرفته شد.

1 - Fetal Bovine Serum

شمارش و تعیین درصد سلول‌های زنده به روش Trypan blue exclusion

غشاء سلول زنده اجازه ورود رنگ‌های غیرالکترولیت (مانند تریپان بلو) را به درون سلول نمی‌دهد، از این خاصیت جهت تعیین درصد سلول‌های زنده استفاده می‌شود که اصطلاحاً Viability test به روش Trypan blue exclusion نامیده می‌شود. جهت شمارش و تعیین درصد حیات، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با ۲۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو ۰/۴٪ (Sigma- امریکا) مخلوط گردید. پس از ۱ الی ۲ دقیقه درصد سلول‌های زنده (سلول‌هایی که رنگ نگرفته‌اند) و سلول‌های مرده (سلول‌هایی که رنگ گرفته‌اند) توسط لام هموسیتومتر نئوبار و زیر میکروسکوپ نوری شمارش شدند. سپس با استفاده از فرمول ذیل، درصد حیات سلول‌ها محاسبه گردید (۲۵).

Viability (٪) = (کل سلول شمارش‌شده/ تعداد سلول زنده) × ۱۰۰

سپس شمارش و تعیین درصد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از رابطه زیر محاسبه شد.

تعداد سلول در هر میلی‌لیتر = تعداد سلول شمارش‌شده در هر مربع لام هموسیتومتر نئوبار × 10^4 × (ضریب رقت)

بهینه کردن تعداد سلول مناسب

به‌منظور در نظر گرفتن بهترین تعداد سلولی در زمان‌های مختلف، ابتدا رقت‌های سلولی مختلف (از ۲۰۰۰۰ الی ۲۰۰۰۰۰) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت موردبررسی قرار گرفت و میزان بقای سلول‌ها با آزمون XTT[۲] مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون از نمک‌های اصلاح‌شده تترازولیوم استفاده می‌شود که حاصل کار پس از متابولیزه شدن توسط سلول زنده، یک ماده رنگی محلول است. سپس تغییر رنگ حاصل‌شده در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید. روش کار به‌این‌ترتیب است که در چاهک‌های پلیت ۹۶ حفره، رقت‌های مختلف سلولی قرار گرفت. پس از سه زمان مختلف ذکرشده در بالا، پلیت‌ها از انکوباتور خارج گردید و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر ماده XTT (sigma-امریکا) اضافه گشت. غلظت XTT که برای تست استفاده می‌شود ۱ mg/ml است. سپس به محلول XTT، ماده PMS[۳] (sigma-امریکا) به نسبت ۱ به ۲۰۰ اضافه گردید و بعد از سه الی چهار ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تغییر رنگ توسط دستگاه الایزاریدر در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر و طول‌موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بهینه کردن غلظت مناسب سدیم بوتیرات

پس از بهینه کردن تعداد سلول مناسب برای سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌ها تحت تیمار با غلظت‌های ۳/۱۲۵ میلی‌مولار الی ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات (Biobasic- کانادا) قرار گرفتند. برای این منظور تعداد مناسب سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تحت تیمار غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات قرار گرفتند. هر غلظت از ماده در سه چاهک تکرار شده و از سوی دیگر آزمایش در حداقل سه تکرار مجزا برای سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. سپس پلیت‌ها داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس‌ازآن سایتوتوکسیسیتی آن‌ها به روش زیر موردبررسی قرار گرفت.

بررسی cytotoxicity توسط تست XTT

جهت بررسی اثر سدیم بوتیرات بر میزان سمیت و مرگ سلولی، پلیت‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از انکوباتور خارج گردیدند و میزان سمیت غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات توسط روش XTT مورد ارزیابی قرار گرفت و IC_{50} تعیین گردید. درصد بقا یا توان‌زیستی سلول‌های تیمار شده با سدیم بوتیرات در غلظت‌های مختلف، به شکل نسبت درصد جذب نوری رنگ تولیدی در سلول‌های تحت تیمار در قیاس با میزان جذب نوری رنگ تولیدی در کنترل منفی (سلول‌های تیمار نشده) نشان داده می‌شود. جهت تعیین IC_{50} از نرم‌افزار آن the JavaScript version of PolySolve (07.20.2013) استفاده شد.

بررسی مورفولوژیکی سلول

به‌منظور بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی سدیم بوتیرات بر رده سلولی $CaCO_2$، ارزیابی مورفولوژیکی سلول‌ها موردبررسی قرار گرفت. در این روش سلول‌ها در محیط کشت مناسب کشت داده شدند و غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات از ۳/۱۲۵ میکرومولار

2 - sodium 2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium) inner saltsodium

3 -N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate

الی ۲۰۰ میکرومولار برای مدت 24 ساعت به چاهک‌های حاوی سلول اضافه شد. سپس سلول‌های تیمار شده با سدیم بوتیرات با استفاده از میکروسکوپ نوری با سلول‌های تیمار نشده مقایسه شدند.

آنالیز آماری

تمامی داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه حاصل سه بار تکرار آزمایش مستقل بوده است. جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه one-way ANOVA (نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۶) و آزمون توکی (Tukey's Test) (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ انجام گرفت.

نتایج

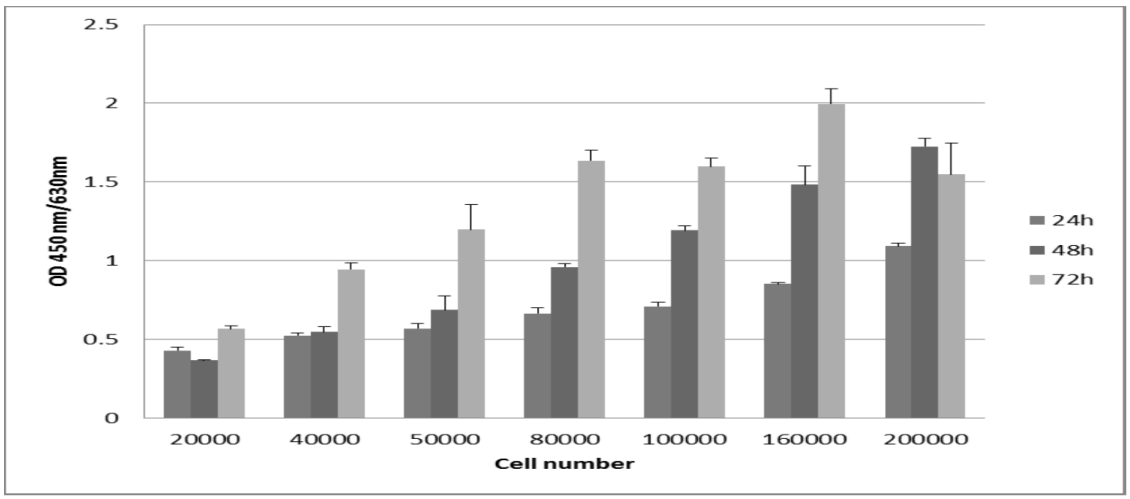
بهینه کردن تعداد سلول موردنیاز برای تست XTT

بهینه‌سازی تعداد سلول با رقت‌های ۲۰ هزار الی ۲۰۰ هزار سلول انجام شد. برای بقا سلول‌ها، انتخاب تعداد سلول کشت یافته بسیار مهم است؛ زیرا سلول‌ها برای بقا به برهمکنش با یکدیگر از طریق انتقال سیگنال نیاز دارند. بهترین جذب نوری در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر برای سلول‌های تکثیرشده، بین ۱ الی ۱/۵ است. با توجه به جذب نوری (OD ها) به‌دست‌آمده در این تحقیق، تعداد سلول مناسب برای تست‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به ترتیب ۲۰۰ هزار، ۱۰۰ هزار و ۵۰ هزار سلول است (نمودار ۱).

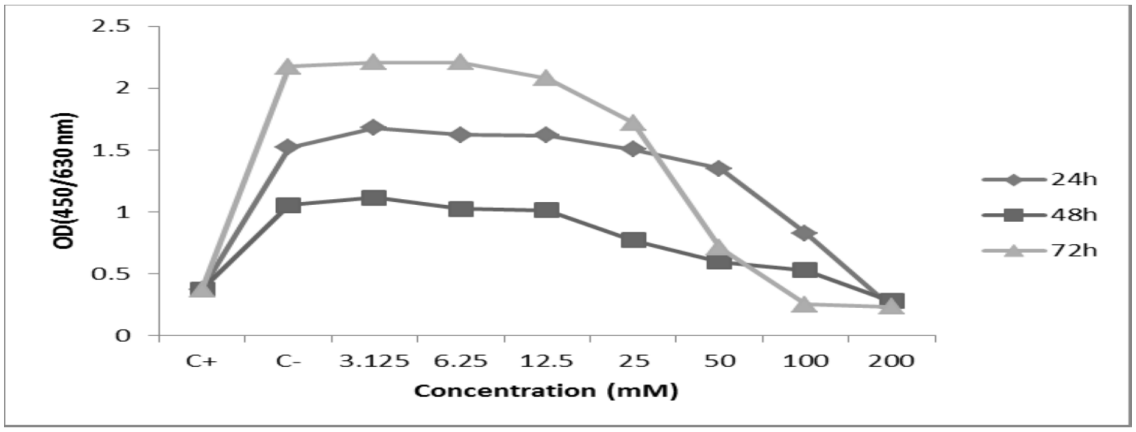
بهینه کردن غلظت مناسب سدیم بوتیرات و بررسی cytotoxicity

به‌منظور تعیین رابطه اثر غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات بازمان بر روی مهار تکثیر سلول‌های $CaCO_2$، میزان توان‌زیستی نمونه‌ها بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار در محدوده غلظتی تعیین‌شده سدیم بوتیرات (۳/۱۲۳ میلی‌مولار الی ۲۰۰ میلی‌مولار) با نمونه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) محاسبه گردید. نمودار ۲ نشان‌دهنده اثرات بازدارندگی وابسته به غلظت سدیم بوتیرات در رشد و تکثیر سلول‌ها در محدوده غلظتی صفر تا ۲۰۰ میلی‌مولار است. در این تست‌ها سلول‌های تیمار نشده به‌عنوان گروه کنترل منفی انتخاب شدند که تنها حاوی سوسپانسیون سلولی و محیط کشت بود (کنترل منفی) و کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون سلولی تیمار شده با ماده کشنده سدیم آزید است. نتایج نشان می‌دهد هرچه غلظت بالا می‌رود، مرگ‌ومیر به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد به‌طوری‌که غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار، غلظت کشنده این ماده برای سلول‌های $CaCO_2$ است.

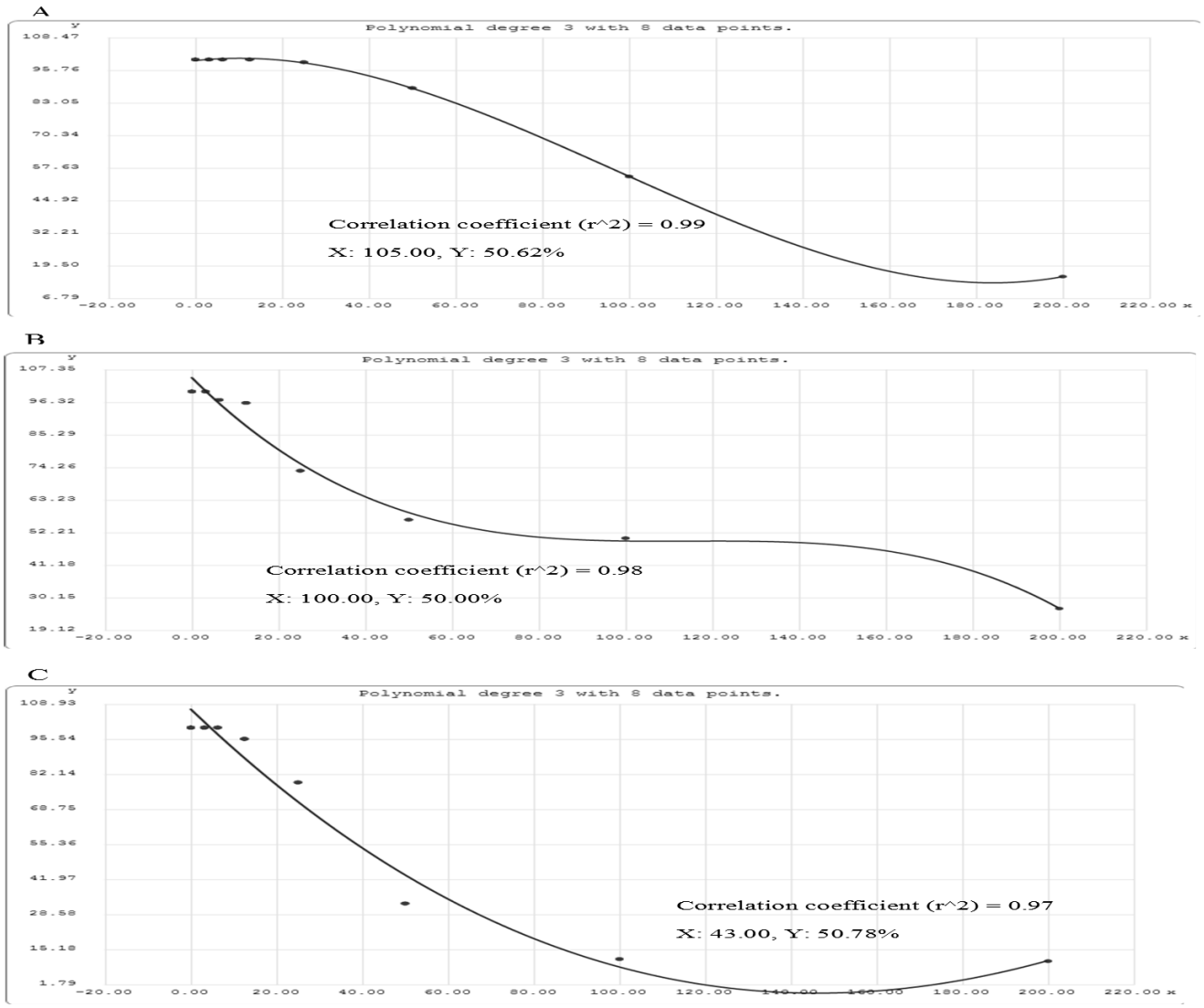
در نمودار ۳ ارتباط میزان توان‌زیستی سلول‌ها با افزایش غلظت سدیم بوتیرات نشان داده شده است. با استفاده از این نمودار غلظت مؤثر (IC_{50}) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۰۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۴۳ میلی‌مولار مشخص شد.



نمودار ۱. تست بهینه‌سازی تعداد سلول مناسب $CaCO_2$ جهت تیمار سلول در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش XTT



نمودار ۲. تیمار رده سلولی $CaCO_2$ با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات در سه بازه زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت
-c: کنترل منفی است که فقط حاوی سوسپانسیون سلولی است و +c: کنترل مثبت است که حاوی سوسپانسیون سلولی به همراه ماده کشنده سدیم آزید است.



نمودار ۳. غلظت مؤثر سدیم بوتیرات برای کاهش 50 درصدی رشد و تکثیر سلول‌ها (IC_{50}). محور افقی (x) نماینده غلظت (میلی مولار) و محور عمودی (y) نماینده درصد بقا سلولی A) IC_{50} برای تیمار ۲۴ ساعت رده سلولی $CaCO_2$ با غلظت های مختلف سدیم بوتیرات، B) IC_{50} برای تیمار ۴۸ ساعت رده سلولی $CaCO_2$ با غلظت های مختلف سدیم بوتیرات، C) IC_{50} برای تیمار ۷۲ ساعت رده سلولی $CaCO_2$ با غلظت های مختلف سدیم بوتیرات.

$CaCO_2$ با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) بر اساس روش XTT در بازه زمانی ۲۴ ساعت به‌صورت (f:۲۸/۸۲۸ ، df:۷ ،p<۰/۰۰۱)، در بازه زمانی ۴۸ ساعت به‌صورت (f: ۸ /۶۳۱، df:۷ ،p<۰/۰۰۱) و در بازه زمانی ۷۲ ساعت به‌صورت (f:۵۵۲ /۴۱۲، df:۷ ،p<۰/۰۰۱) است. مقایسه میانگین توان زیستی سلول‌های سرطانی تیمار شده در سه بازه زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، اختلاف معنی‌داری میان تمام گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف سدیم بوتیرات نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱). همچنین با افزایش غلظت سدیم بوتیرات، میانگین توان‌زیستی سلول‌ها کاهش یافته است.

نتیجه مقایسه داده‌های حاصل از تیمار سلول‌های $CaCO_2$ در غلظت IC_{50} سدیم بوتیرات با گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) در جدول ۱ آورده شده است. سلول‌های تیمار شده در غلظت IC_{50}، در مقایسه با گروه کنترل پس از سه بازه زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند (p<۰/۰۵).

جدول ۱- نتایج تحلیل تست Tukey

زمان تیمار	گروه	غلظت IC_{50}	تفاوت میانگین	احتمال
۲۴ ساعت	کنترل	۱۰۵ mM	۰/۹۸۹	p<۰/۰۵
۴۸ ساعت	کنترل	۱۰۰ mM	۰/۴۸۲	p<۰/۰۵
۷۲ ساعت	کنترل	۴۳ mM	۱/۴۶۲	p<۰/۰۵

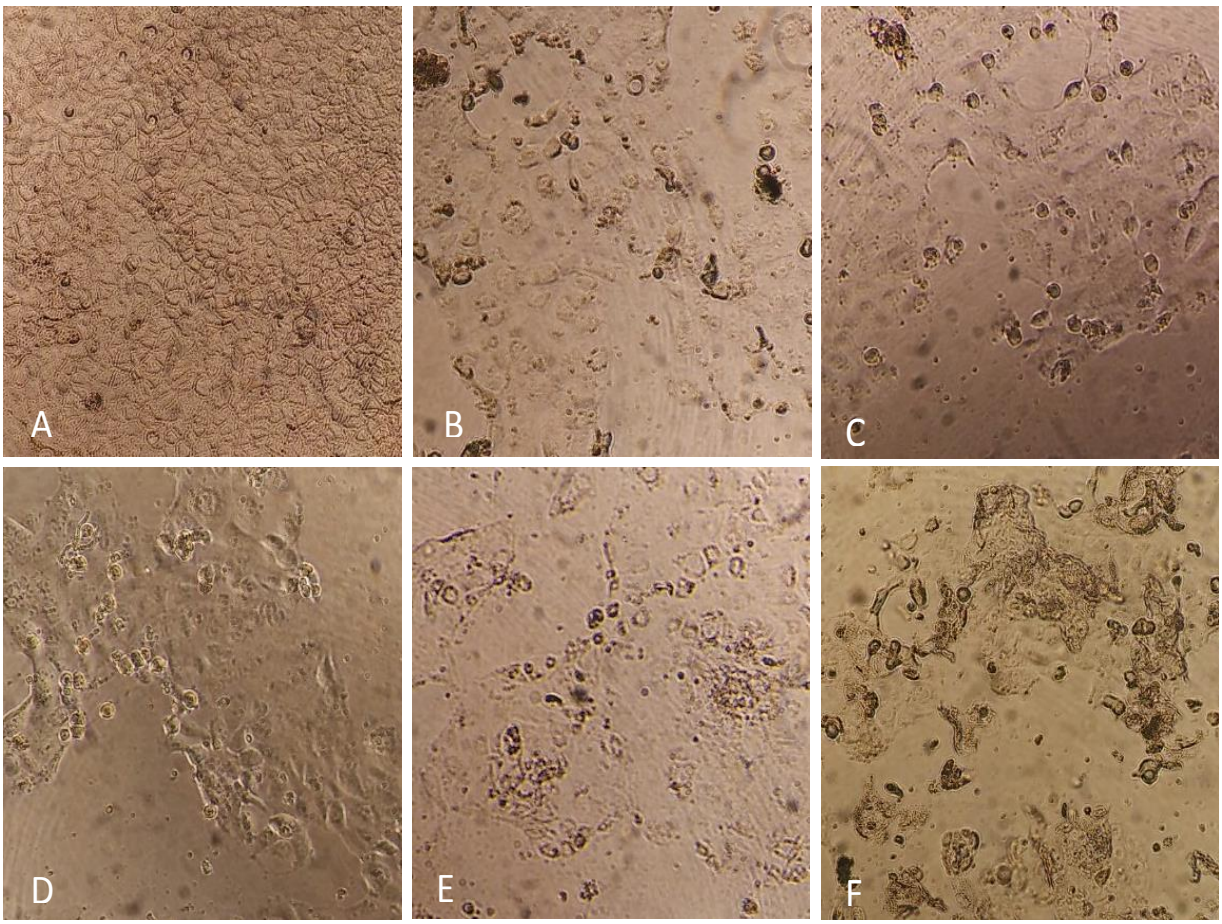
بررسی مورفولوژیکی سلول

به‌منظور بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی سدیم بوتیرات بر رده سلولی $CaCO_2$، ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات، تغییرات مورفولوژیکی با سلول‌های تیمار نشده موردبررسی قرار گرفت. نتیجه این بررسی نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات در شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل) تغییر محسوسی را ایجاد کرده است (شکل ۱). به‌طوری‌که سلول‌های تیمار نشده به‌طور کامل و طبیعی به کف فلاسک چسبیده‌اند و شکل طبیعی خود را حفظ کرده‌اند. ولی در سلول‌های تیمار شده گرانوله شدن سلول‌ها مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت این ماده، میزان مرگ و گرانوله شدن سلولی افزایش می‌یابد. این نتایج حاکی از آن است که سدیم بوتیرات اثر ضد تکثیری در غلظت IC_{50} دارد و می‌تواند آپوپتوز سلولی را فعال نماید ولی در غلظت بالای IC_{50} دارای خاصیت سایتوتوکسیسیتی بر روی رده سلولی $CaCO_2$ است.

بحث و نتیجه گیری

تاکنون مطالعات متعددی به‌منظور شناسایی کامل نقش تغییرات مولکولی مرتبط با بروز آپوپتوز و نقش هر یک از آن‌ها در بروز سرطان کولون انجام شده است. شواهد به‌دست‌آمده در این زمینه حاکی از نقش مجموعه‌ای پیچیده از تغییرات مولکولی در بروز آپوپتوز است که ازجمله این عوامل می‌توان به نقش مهارکننده‌های هیستون داستیلاز (HDAC) اشاره نمود. بر این اساس مهارکننده‌های HDAC باعث القای تمایز، توقف چرخه سلولی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) در سلول‌های بدخیم می‌شوند (۲۶). نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که مهارکننده‌های HDAC، هر دو مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز را فعال می‌نمایند. تنظیم فعالیت سرکوبگری توموری P53 وP73 که در القاء آپوپتوز نقشی کلیدی ایفا می‌کنند ازجمله مهم‌ترین نقش‌های این مهارکننده‌ها بشمار می‌رود (۲۷). علاوه بر اثرات ضد تکثیری مهارکننده‌های HDAC، ویژگی‌های ضدالتهابی این مهارکننده‌ها نیز از دیگر ویژگی‌های شناخته‌شده آن‌ها بشمار می‌رود. این کارایی دوگانه مهارکننده‌های HDAC از اهمیت قابل‌توجهی برخوردار است، چراکه التهاب مزمن، با افزایش احتمال پیشرفت سرطان‌زایی همراه است (۲۸).

ازجمله مهارکننده‌های این آنزیم می‌توان به سدیم بوتیرات اشاره نمود. باکتری‌هایی که در کولون وجود دارند، مواد حاوی فیبر را تخریب و اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه ازجمله بوتیرات‌ها را آزاد می‌کنند (۲۹). سدیم بوتیرات منبع اصلی انرژی برای سلول‌های اپیتلیال نرمال کولون است و مانع از سرطان‌زایی



شکل ۱. مقایسه اثر غلظت‌های مختلف سدیم بوتیرات روی مورفولوژی سلول‌های $CaCO_2$ تیمار شده با سلول‌های تیمار نشده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون. A) سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل)، B) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۲/۵ میلی‌مولار سدیم بوتیرات، C) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میلی‌مولار سدیم بوتیرات، D) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات، E) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات، F) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار سدیم بوتیرات، تصاویر با بزرگنمایی (10X) می‌باشند.

کولون می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که سدیم بوتیرات توسط حاملین MCT1[۴] و SMCT1[۵] به سلول‌های اپیتلیال نرمال کولون منتقل می‌شود ولی در سلول‌های توموری بیان این پروتئین‌ها و گلیکولیز کاهش یافته و درنتیجه جذب سدیم بوتیرات توسط سلول‌های توموری کاهش می‌یابد (۳۰). بر مبنای تحقیقات انجام‌یافته بر روی مدل‌های حیوانی، استفاده از غلظت‌های اندک سدیم بوتیرات می‌تواند منجر به تحریک تمایز سلولی و نیز مهار چرخه سلولی و به دنبال آن القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود (۳۱). مطالعات متعددی به‌منظور بررسی نقش مهارکننده‌های HDAC در انواع سرطان‌ها انجام شده است. ازجمله نخستین تحقیقات انجام‌شده در این زمینه می‌توان به مطالعه Young و همکاران در سال ۱۹۸۰ اشاره نمود که اثر سدیم بوتیرات بر رشد و مورفولوژی رده‌های سلولی SW 620 و SW 480 سرطان کولون انسانی موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق حاکی از کاهش میزان رشد رده‌های سلولی تیمار شده با سدیم بوتیرات در مقایسه با گروه کنترل بود. از سوی دیگر شواهد به‌دست‌آمده حاکی از عدم وجود اثر یکسان سدیم بوتیرات در دو رده سلولی SW 620 و SW 480 بود. بر این اساس میزان تأثیرگذاری سدیم بوتیرات بر میزان رشد در یک غلظت معین در رده سلولی SW 620 در مقایسه بارده سلولی

4. monocarboxylate transporter 1
5. sodium-coupled monocarboxylate transporter 1

SW 480 بسیار چشمگیرتر بود. این یافته بیانگر این نکته است که میزان پاسخ به سدیم بوتیرات در رده‌های سلولی مختلف، الزاماً در یک غلظت معین یکسان نیست (۳۲).

در این پژوهش بر اساس تعیین توان‌زیستی نتیجه‌گیری می‌شود که خاصیت ضد سرطانی سدیم بوتیرات وابسته به دوز و زمان تیمار است. چون با افزایش دوز تیمار، تأثیر ضد سرطانی آن بر روی سلول‌ها افزایش می‌یابد (غلظت IC_{50}). نتایج به‌دست‌آمده بیانگر اثر سایتوتوکسیسیتی سدیم بوتیرات بر روی رده سلولی $CaCO_2$ است که با نتایج گزارش‌شده اثر این ماده بر روی رده‌های سلولی دیگر هم‌راستا است.

بر اساس نتایج حاصل از XTT، کاهش توانایی حیات سلول‌های $CaCO_2$ در تیمار با سدیم بوتیرات دیده شد که با آزمایش‌ها محققین دیگر مطابقت می‌کند ولی ازآنجایی‌که سلول‌های مختلف ازنظر ژنتیکی پاسخ‌دهی متفاوتی به دوزهای دارویی دارند و میزان پاسخ به سدیم بوتیرات در رده‌های سلولی مختلف، الزاماً در یک غلظت معین یکسان نیست، نتایج این تحقیق نشان داد که دوز بهینه برای تیمار این سلول‌ها به‌منظور استفاده داروی ضد سرطانی، در بازه زمانی ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۰۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میلی‌مولار و ۴۳ میلی‌مولار است.

همچنین در این پژوهش، بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها نشان داد که در سلول‌های تیمار شده با سدیم بوتیرات، تغییراتی مانند تشکیل اجسام آپوپتوتیک، حباب زدگی غشا و فروپاشی هسته‌ای مشاهده می‌شود که وجود این تغییرات یکی از پیامدهای وقوع آپوپتوز است. اولین حدس در این خصوص، القاء آپوپتوز به‌عنوان عامل اصلی مرگ سلولی در زمان تیمار دارویی و کاهش درصد سلول‌ها در حضور سدیم بوتیرات است که با نتایج محققین دیگر هم‌راستا است. ولی با توجه به نتایج این تحقیق نمی‌توان آپوپتوز را اثبات کرد و برای این امر، انجام تست‌های تخصصی نیاز است.

سال ۲۰۰۲، Hague و همکاران به بررسی نقش اسیدهای چرب دارای زنجیره کوتاه بانام‌های سدیم بوتیرات، استات و پروپیونات در القاء آپوپتوز در رده سلولی آدنوما و کارسینوما پرداختند. نتایج حاکی از القاء آپوپتوز توسط هر سه اسید چرب بود؛ بااین‌حال بیشترین میزان آپوپتوز به‌واسطه استفاده از سدیم بوتیرات به وقوع پیوست اگرچه میزان وقوع در تمامی رده‌های سلولی یکسان نبود (۳۳). در سال ۲۰۰۶، Orchel و همکاران اثر سدیم بوتیرات را بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو در رده سلولی $CaCO_2$ سرطان کولون انسانی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که سدیم بوتیرات تمایز و آپوپتوز را در این رده سلولی القا می‌کند که همراه با تغییر در بیان آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو است (۳۴). Kitazono و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات سدیم بوتیرات را به‌عنوان یک مهارکننده هیستون داستیلاز روی سلول‌های سرطان پانکراس رده سلولی SW-1990 و JHP-1مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که سدیم بوتیرات بیان p53 را در این سلول‌ها القا می‌کند و اپوپتوز در سلول‌های تحت تیمار با سدیم بوتیرات بیشتر از سلول‌های گروه کنترل رخ می‌دهد (۳۵). Tailor و همکاران اثر سدیم بوتیرات را بر روی رده‌های سلولی SW480 و HCT116 سرطان کولون انسانی بررسی کردند و نشان دادند که تیمار سدیم بوتیرات باعث کاهش معنی‌دار تعداد میتوکندری می‌شود که از طریق به هم پیوستن میتوکندری‌ها اتفاق می‌افتد. این هم‌جوشی میتوکندری‌ها توسط سدیم بوتیرات به دلیل کاهش بیان ژن DRP1[6] که یک تنظیم‌کننده کلیدی مهم در به هم پیوستن میتوکندری‌ها است صورت می‌گیرد. آن‌ها گزارش کردند سدیم بوتیرات می‌تواند با تغییر سطح DRP1 و القا توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون باعث به هم پیوستن و یا ادغام میتوکندری‌ها گردد (۳۶). همچنین در سال ۲۰۱۴، Yamamura و همکاران اثر سدیم بوتیرات را به‌عنوان مهارکننده‌ی هیستون داستیلاز روی رده سلولی HSC-3 سرطان دهان بررسی کردند و نشان دادند که بوتیرات بیان فاکتورهای lymphangiogenic را در این رده سلولی مهار می‌کند و می‌تواند احتمالاً به‌عنوان داروی ضد متاستاز در درمان سرطان دهان استفاده شود (۳۷). Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات سدیم بوتیرات را به‌عنوان مهارکننده‌ی هیستون داستیلاز روی استرس شبکه آندوپلاسمی (ERS[7]) و اتوفاژی در رده سلولی HCT-116 و HT-29 سرطان کولورکتال بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که سدیم بوتیرات باعث سرکوب تکثیر سلولی، القای اتوفاژ و مرگ سلولی می‌شود (۳۸). در یافته‌های

6. dynamin-related protein 1
7. Endoplasmic Reticulum Stress

به‌دست‌آمده از مطالعات ذکرشده حاکی از نقش سدیم بوتیرات در القاء آپوپتوز و به دنبال آن مرگ سلولی در سلول‌های تحت تیمار با آن است. مطالعات گذشته نشان داده است که این ترکیب شیمیایی با مکانیسم‌های مختلفی ازجمله فعال‌سازی مسیر MAPK، مهار فعال‌سازی ERK، افزایش استیلاسیون H4 و H3 و همچنین کاهش متیلاسیون در نواحی غنی از CpG در برخی پروموتر ژن‌ها سبب افزایش بیان ژن‌ها می‌گردد (۲۶، ۲۷).

جمع‌بندی نهایی این است که مهارکننده‌های هیستون داستیلاز (HDAC) سبب تغییراتی در وضعیت استیلاسیون کروماتین، تغییرات بیان ژن، ایجاد آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، مهار رگ‌زایی و مهار متاستاز می‌شوند. ازاین‌رو تیمار سلول‌های سرطانی با مهارکننده‌های HDAC می‌تواند منجر به القا آپوپتوز در آن‌ها شود. به‌این‌ترتیب استفاده از مهارکننده‌های HDAC در سلول‌های سرطانی می‌تواند امیدی برای درمان باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی با کد ۱۳۶۹۵۰۶۰۹۰۰۱۶ است که در شورای پژوهشی واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، مرکز تحقیقات زیست‌فناوری کاربردی به تصویب رسیده است؛ و لذا از این مرکز تحقیقاتی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Dolatkhah R, Somi MH, Bonyadi MJ, Kermani IA, Farassati F, Dastgiri S. Colorectal Cancer in Iran: Molecular Epidemiology and Screening Strategies. J Cancer Epidemiol. 2015;2015 (2015):10.
2. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology :incidence, mortality, survival, and risk factors Clin Colon Rectal Surg. 2009;22(4):191–7.
3. Fung KYC, Cosgrove L, Lckett T, Head R, Topping DL. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. Br J Nutr. 2012;108(5):820-31.
4. Gunter MJ, Leitzmann MF. Obesity and colorectal cancer: epidemiology, mechanisms and candidate genes. J Nutr Biochem. 2006;17(3):145-56.
5. Schnekenburger M, Diederich M. Epigenetics offer new horizons for colorectal cancer prevention. Curr Colorectal Cancer Rep. 2012;8(1):66-81.
6. Striethолt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. Arthritis Res The. 2008;10(5):219.
7. Zheng YG, Wu J, Chen Z, Goodman M. Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. Med Res Rev. 2008;28(5):645-87.
8. Berger SL. An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. Oncogene. 2001;20(24):3007-13.
9. Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. Med Res Rev 2006;26(4):397-413.
10. Hess-Stumpp H. Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic. Eur J Cell Biol. 2005;84(2-3):109-21.
11. Fukuda H, Sano N, Muto S, Horikoshi M. Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. Brief Funct Genomic Proteomic. 2006;5(3):190-208.
12. Hubbs JL, Zhou H, Kral AM, Fleming JC, Dahlberg WK, Hughes BL, et al. Amino acid derivatives as histone deacetylase inhibitors Bio & Med Chem Let. 2008;18(1): 34-8.
13. Cang S, Ma Y, Liu D. New clinical developments in histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer. J Hematol Oncol. 2009;2(22):1-11.
14. Gallinari P, Marco SD, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. Cell Res. 2007;17(3): 195-211.
15. Balakin KV, Ivanenkov YA, Kiselyov AS, Tkachenko SE. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: latest developments, trends and medicinal chemistry perspective. Anticancer Agents Med Chem 2007;7(5):576-92.
16. Mottet D, Castronovo V. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. Clin Exp Metastasis. 2008;25(2):183-9.
17. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. Anticancer Drugs. 2002;13(1):1-13.
18. Shankar S, Srivastava RK. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis .Adv Exp Med Biol. 2008;615:261-98.
19. Witt O, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Oehme I. Targeting histone deacetylases in neuroblastoma. Curr Pharm 2009;15(4):436-47.
20. Kouraklis G, Misiakos EP, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors as a potential therapeutic agent for human cancer treatment Target Oncol. 2006;1(1):34–41.

21. Richon VM, O'Brien JP. Histone Deacetylase Inhibitors: A New Class of Potential Therapeutic Agents for Cancer Treatment. Clin Cancer Res. 2002;8(3):662–4.
22. Davie JR. Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. J Nutr Biochem. 2003;133(7 Suppl):2485S-93S.
23. Khan S, Jena GB. Protective role of sodium butyrate, a HDAC inhibitor on beta-cell proliferation, function and glucose homeostasis through modulation of p38/ERK MAPK and apoptotic pathways: Study in juvenile diabetic rat. Chem Biol Interact. 2014;213 (2014):1-12.
24. Perrine SP. Fetal globin stimulant therapies in the beta-hemoglobinopathies. principles and current potential. Pediatr Ann. 2008;37(5): 339-46.
25. Louis KS, Siegel AC, GA. L. Comparison of manual versus automated trypan blue dye exclusion method for cell counting, in: M.J. Stoddart (Ed.), Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. Series Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, New York. 2011:7–12.
26. Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. Nature biotechnology. 2007;25(1):84-90.
27. Wanczyk M, Roszczenko K, Marcinkiewicz K, Bojarczuk K, Kowara M, Winiarska M. HDACi–going through the mechanisms. Front Biosci. 2011;16(1):340-59.
28. Glauben R, Sonnenberg E, Zeitz M, Siegmund B. HDAC inhibitors in models of inflammation-related tumorigenesis. Cancer letters. 2009;280(2):154-9.
29. Topping D.L., Clifton PM, . short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol Rev. 2001;81(3):1031-64.
30. Gonçalves P, Martel F. Butyrate and Colorectal Cancer: The Role of Butyrate Transport. Curr Drug Metab. 2013;14(9):994-1008.
31. Rai M, Soragni E, Jenssen K, Burnett R, D Herman , Coppola G, et al. HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model PLoS One. 2008;3(4):e1958.
32. Kim YS, Tsao D, Siddiqui B, Whitehead JS, Arnstein P, Bennett J, et al. Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. Cancer Lett. 1980;45(S5):1185-92.
33. Hague A, Elder DJ, Hicks DJ, Paraskeva C. Apoptosis in colorectal tumour cells :induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate Int J Cancer. 1995;60(3):400-6.
34. Orchel A, Gruchlik A, Weglarz L, Dzierzewicz Z. Influence of sodium butyrate on antioxidative enzymes activity in $CaCO_2$ cell lines. Acta Pol Pharm. 2006;63(5):441-2.
35. Kitazono M, Shinchi H, S Ishigami S, Sh Ueno Sh, Natsugoe S. Effects of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, on 53-kDa protein expression and sensitivity to anticancer drugs of pancreatic cancer cells. Curr Ther Res Clin Exp. 2010;71(3):162–72.
36. Tailor D, Hahm E. R, Kale K, Singh S. V, Singh R. Sodium butyrate induces DRP1-mediated mitochondrial fusion and apoptosis in human colorectal cancer cells. Mitochondrion. 2014;16(1):55-64.
37. Yamamura T, Matsumoto N, Matsue Y, Okudera M, Nishikawa Y, Abiko Y, et al. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, regulates Lymphangiogenic factors in oral cancer cell line HSC-3. Anticancer Res. 2014;34(4):1701-8.
38. Zhang J, Yi M, Zha L, Chen S, Li Z, Li C, et al. Sodium Butyrate Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Colorectal Cells: Implications for Apoptosis. PLoS One. 2006;11(1):e0147218.

Original Article

Investigating Anticancer Effects of Sodium Butyrate on Human Colon Cancer $CaCO_2$ Cell Line

Forouzesh F[1*], Talebi S[2], shahbazi N[3]

1. Department of Genetics, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Medical Genetics and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran
3. Applied Biotechnology Research Center, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 24 Sep 2017 Accepted: 24 Dec 2017

Abstract

Background & Objective: Sodium butyrate (NaBu), a histone deacetylase inhibitor, is an anticancer drug for multiple cancers. The objective of this research is to study the anticancer effects of sodium butyrate on colon cancer $CaCO_2$ cell lines.

Material & Methods: $CaCO_2$ cell lines were cultured and then treated with various concentrations of NaBu (from 3.125mM to 200mM). After 24h, 48h and 72h incubation, the cytotoxicity was measured by XTT assay. The statistical significance of difference analyzed by one-way ANOVA/Tukey test. Also, in this research, the morphologic changes are considered by invert microscopy.

Results: The results showed that NaBu inhibited the growth in a time- and dose-dependent manner. XTT assays showed that treatment with NaBu at high concentrations significantly inhibited the growth of $CaCO_2$ cells. After 24, 48 and 72h, IC_{50} for $CaCO_2$ cells were 105, 100 and 43 mM respectively. Results confirmed the anti-proliferative effect of Sodium butyrate on this cell lines. The results of morphological studies indicated that sodium butyrate has a growth inhibitory effect on IC_{50} concentration and it can arrest the cell cycle.

Conclusion: These results demonstrate that butyrate inhibited the growth of colorectal cancer cells. It caused probably cell death via the induction of apoptosis. These findings may open interesting perspectives in human colorectal cancer treatment strategy.

Keywords: Colorectal cancer, Apoptosis, Sodium butyrate, Histone deacetylase inhibitor, $CaCO_2$ cell line

***Corresponding Author: Flora Forouzesh,** Department of Genetics, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: f8forouzesh@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-2747-3479

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 735-745