فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۲ ص. ۳۴-۲۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر داروهای اگزالی‌پلاتین و پاکلی تاکسل برسلول‌های سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز۳، کاسپاز۹ وP53

هما محمودزاده[۱*]، جواد بهارآرا[۲]، یگانه رضایی دلوئی[۳]

[۱] گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

[۲] گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

[۳] زیست شناسی سلولی- مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): h.mahmoodzadeh@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

DOI: 10.30495/jdb.2023.1966139.1329 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.3.5

چکیده

هدف بررسی اثرات سمیت سلولی پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین بر رده سلولی سرطان کولون (HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳، ۹و P53 می‌باشد. ابتدا سمیت سلولی داروهای پاکلی‌تاکسل و اگزالی پلاتین و اثر توام آنها با غلظت‌های مختلف بر رده سلولی HT29 با روش MTT بررسی شد و غلظت ۵۰ درصد کشندگی (IC50) آن تعیین شد. میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد. هم چنین بررسی آپوپتوز سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V/PIو DAPI انجام شد. پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین به ترتیب در غلظت‌های ۳/۲۵ و ۰/۰۰۰۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین اثر سمیت سلولی را دارد و میزان IC50 آن ۰/۰۰۰۱۶ و ۱۲/۵ μg/ml محاسبه شد. تیمار همزمان داروها زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش داد. بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹, P53 در سلول‌های سرطان کولون تیمار شده نیز افزایش یافت. نتایج آزمون DAPI نشان دهنده ی قطعه قطعه شدن هسته‌ها و آپوپتوز در گروه‌های تیماری همزمان بود. بررسی آپوپتوز با استفاده از Annexin V/PI نشان می‌دهد که ۹۸ درصد سلول‌های گروه شاهد سالم می‌باشند و درصد زیادی از سلول‌ها تحت تیمار دچار آپوپتوز شده‌اند. با توجه به سمیت سلولی و القای فرایند آپوپتوزیس در رده سلولی سرطان کولون توسط داروهای پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این داروها گزینه مناسب جهت درمان سرطان کولون می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: اگزالی‌پلاتین، پاکلی‌تاکسل، سرطان کولون، انکسین، ژن کاسپاز، ژن p53.

مقدمه

سرطان نوعی بیماری است که در آن سلول‌های بدن به علت آسیب مکانیسم‌های تنظیم کننده طبیعی آنها به طور غیر قابل کنترلی رشد می‌کنند. این بیماری ممکن است از طریق خون و سیستم لنفاویک به جاهای دیگر منتشر شود [۱،۲]. در مرحله اولیه رشد تومور، به طور گسترده اختلال عملکرد میتوکندری رخ

می‌دهد و سنتز ATP مختل می‌شود [۳]. یک سلول وقتی سرطانی می‌شود که ژن های معینی که مسئول کنترل فرآیندهای حیاتی آن از قبیل تقسیم سلولی هستند، آسیب ببینند. درمان سرطان به عنوان یک چالش بزرگ در سراسر جهان مطرح است. بنابراین توسعه درمان‌های موثر با حداقل عوارض جانبی مهم است [۴]. یکی از مهم ترین علل اصلی مرگ و میر و دومین علت شیوع سرطان در بین زنان و سومین علت شیوع سرطان در بین مردان سرطان روده بزرگ است. سرطان کولون یا کولورکتال بدخیمی های سلول‌های مربوط به دیواره روده بزرگ است که بصورت کنترل نشده رشد و تکثیر می‌یابند [۵]. علت سرطان روده در اکثر موارد مشخص نیست؛ در مجموع تغییر یافتن سلول‌های سالم منجر به بروز سرطان روده بزرگ می‌شود[۶]. جهش‌های ژن وراثتی سرطان را اجتناب‌ناپذیر نمی‌سازد، اما احتمال ابتلا به آن به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد [۷].

درمان‌های رایج سرطان کولورکتال شامل درمان‌های موضعی، درمان‌های سیستمیک، جراحی، لاپاراسکوپی، شیمی درمانی، درمان بیولوژیک، یا پرتودرمانی می‌باشد. اگرچه این روش‌ها کمک زیادی در جلوگیری از پیشرفت بیماری دارند، اما بیشتر آنها همراه با عوارض جانبی بوده و علاوه بر هزینه بالا، ممکن است نتیجه ای نیز حاصل نگردد. به همین منظور یافتن روشی مناسب‌تر، کم هزینه‌تر و بدون عارضه در جهت درمان این بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.اگزالی‌پلاتین، یک ترکیب دی‌آمینو سیکلوهگزان نسل سوم که دارای طیف گسترده ای از فعالیت های ضد توموری است، به نظر می‌رسد که از نظر تهوع، استفراغ، سمیت کلیوی و سمیت گوش، مشخصات ایمنی بهتری نسبت به سیس دارد، در نتیجه داروی شیمی‌درمانی اگزالی به طور گسترده برای درمان سرطان‌های کولون و رکتوم مورد استفاده قرار می‌گیرد [۸]. مکانیسم اثر این دارو به این صورت است که از طریق پیوند متقاطع کمپلکس های با مولکول‌های DNA، سبب جلوگیری از تکثیر و نسخه‌برداری سلولی می‌شود [۹]. اگزالی پلاتین با از بین بردن سلول‌های سرطانی و کند کردن رشد تومور عمل می‌کند اما مکانیسم دقیق مرگ سلول‌های سرطانی به طور کامل مشخص نیست [۱۰]. مطالعات بالینی نشان داده‌اند که اگزالی‌پلاتین، یک عامل شیمی‌درمانی قوی است به ویژه زمانی که با دیگر معرف‌ها ترکیب شود. اگزالی‌پلاتین در IC_{50} خود باعث آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در فاصله فاز M-G2 می‌شود[۱۱].

هم چنین ثابت شده است که پاکلی تاکسل، یک عامل ضد سرطانی است که به میکروتوبول‌ها متصل و باعث افزایش پایداری می‌شود که منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز می‌شود. این دارو، تجمع میکروتوبول‌ها از دیمرهای توبولین را تسهیل می‌کند و از طریق جلوگیری از دپلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها باعث تثبیت آنها می‌گردد. این ثبات مانع از دوباره سازمان یافتن فعال و طبیعی شبکه میکروتوبول‌ها می‌شود که برای اینترفاز حیاتی و اعمال سلولی میتوزی ضروری است که سبب القا آرایش غیرطبیعی و یا خوشه‌ایی از میکروتوبول‌ها در طی چرخه‌ی سلولی گشته و منجر به ایجاد آسترهای متعدد از میکروتوبول‌ها در طی میتوز می‌گردد. پاکلی‌تاکسل می‌تواند به طور موثر آپوپتوز سلول سرطانی را ارتقا دهد و برای سلول‌های تومور دارای جهش ژن K-ras موثر است [۱۲].

گسترش روز افزون سرطان کولون و مشکلات فراوان ناشی از آن از یک سو و عدم موفقیت کافی روش‌های درمانی رایج و سنتی در مبارزه اختصاصی با آن موجب توجه ویژه محققین نسبت به روش‌های درمانی هدفمند گشته است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی اثرات اگزالی‌پلاتین و ترکیب آن با دارو پاکلی‌تاکسل بر روی رده سلولی سرطان کولون(HT29) و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

رده سلولی HT29(سلول‌های سرطانی کولون انسانی) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا محیط کشت RPMI 1640 (Bioidea, Iran) غنی شده با (V/V)استرپتومایسین- پنی سیلین وFBS 10% کشت داده شدند. .

برای شمارش سلول‌های زنده جهت بررسی میزان بقاء و تکثیر سلول‌های تیمار شده نسبت به شاهد از رنگ آمیزی تریپان بلو و لام هموسایتومتر (لام نئوبار) استفاده شد. اساس این آزمایش بدین ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ تریپان بلو نفوذناپذیر می‌باشند، حال آنکه سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند.

آزمون MTT جهت بررسی سمیت سلولی پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین

به منظور بررسی اثر سمیت داروهای اگزالی پلاتین و پاکلی تاکسل و هم افزایی این دو دارو بر سلول‌های سرطان روده بزرگ (HT29) از روش رنگ‌سنجی MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. در پلیت ۹۶ خانه غلظت‌های مختلف (۰۰۰۱۶ +۳٫۱۲۵ و ۰٫۰۰۰۳۱ +۳٫۱۲۵ ۰٫۰۰۰۶۲ + ۳٫۱۲۵، ۰٫۰۰۰۱۶ + ۶٫۲۵، ۰٫۰۰۰۳۱ + ۶٫۲۵،۰٫۰۰۰۶۲ + ۶٫۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی HT29 تیمار شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، محتوای چاهک پلیت ۹۶خانه‌ای به دقت خارج شد و به ان مقدار ۱۰ میکرولیتر از رنگ MTT Tetrazolium Test (Microculture) اضافه شد، سپس پلیت سلول‌ها به مدّت ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور CO_2 ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت ؛ بعد از گذشت این مدّت، مایع رویی سلول‌ها را خارج کرده و رنگ MTT جداسازی شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده به وسیله سلول‌های زنده در DMSoدی متیل سولفوکسید حل شد.در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر "EPOCH" درطول موج ۵۶۰-۵۷۰ نانومتر خوانده شدودرصد سلول‌های زنده توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{\text{میانگین جذب نمونه تیمار}}{\text{میانگین جذب نمونه کنترل}} \times 100$$

هم چنین میزان دوز ۵۰درصد کشندگی(IC50 یا Half maximal inhibitory concentration) نیز محاسبه شد

رنگ‌آمیزی DAPI

این تست جهت رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها، بررسی آپوپتوز، بررسی میزان تراکم و یا قطعه قطعه شدن کروماتین در سلول‌های تیمار شده و مقایسه آن با گروه شاهد انجام گرفت. رنگ DAPI از شرکت Sigma, Iran تهیه شد. در این تست ابتدا مقدار ۵×۱۰^{۴} عدد سلول رده‌ی HT29 به آرامی به کاور اسلیپ یک پلیت ۶ خانه اضافه شد .سپس از گوشه هر چاهکِ پلیت ۶ خانه به آرامی؛ ۱ میکرولیتر محیط کشت کامل برای گروه کنترل و محیط‌های تیماری اضافه شد.بعد از گذشت ۲۴ ساعت؛ محیط رویی تمامی گروه‌ها برداشته شد و مقدار ۴۰۰ میکرولیتر فیکساتور سلولی (متانول)، به پلیت اضافه شد. سپس سلول‌ها مجددا سانتریفیوژ شده و PBS جایگزین محلول رویی شد.سپس رنگ‌آمیزی با استفاده از ۴۰۰ میکرولیتر DAPI انجام شدو در انتها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت هسته مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون فلوسایتومتری آنکسین PI/V

به منظور تعیین مرگ سلولی و بررسی القاء آپوپتوز در سلول‌های HT29 سرطان کولون انسانی، آزمون فلوسایتومتری آنکسین PI/V انجام شد. مراحل این تست بر اساس دستورالعمل مربوط به کیت " Annexin V-FITC Apoptosis Staining Detection Kit (ab14085)"انجام شد. بدین منظور سلول‌های HT29 سرطان کولون انسانی به تعداد ۵۰۰ هزار با غلظت‌های مؤثر از داروی پاکلی تاکسل و اگزالی پلاتین و ترکیب توأم دو دارو در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند.. بعد از انکوباسیون، رسوب سلولی با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و پس از یک بار شستشو با ۷۰۰ میکرولیتر PBS با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر باند کننده X۱ مواجه شد. درادامه ۲ میکرولیتر انکسین V و۱/۵میکرولیتر پروپیدیوم یداید (PI) به هر نمونه اضافه شد؛ در نهایت نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند .لازم به ذکر است که جهت حذف رنگ زمینه برای هر نمونه یک نمونه کنترل (بدون آنکسین V و PI) در نظر گرفته شد و سپس میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

اندازه گیری بیان ژن های کاسپاز ۳و۹و p53

میزان بیان ژن های اپوپتوزی P53و کاسپاز ۳ و ۹ در سلول های HT29 تیمارشده با داروهای اگزالی پلاتین و پاکلی تاکسل و هم افزایی این دو دارو از روش Real time PCR کمی نسبی (PCR-qRT) و بر اساس پروتکل کیت کاسپاز ۳ و ۹ (Abcam, Germany) سنجیده شد.

آنالیز آماری

داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم‌افزارآماری SPSS16 وآزمون آماری Duncan تجزیه و تحلیل شدند. لازم به ذکر است به منظور جلوگیری از خطا، آزمون‌ها سه بار تکرار شدند.

نتایج

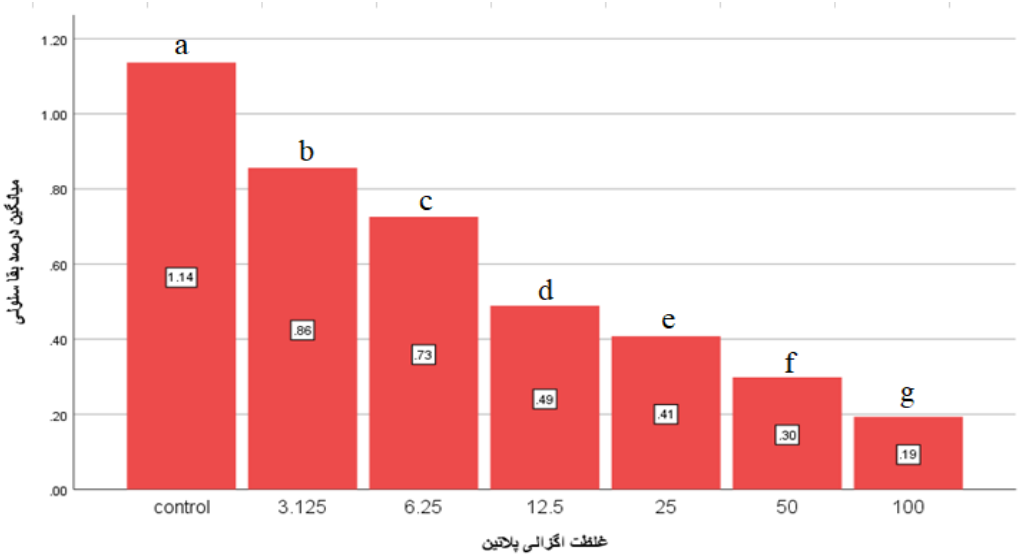
آزمون MTT در تیمار سلول‌های HT29 با داروی اگزالی پلاتین به مدت ۲۴ ساعت تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های مختلف ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دارو اگزالی پلاتین با استفاده از تستMTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد داروی اگزالی پلاتین در غلظت ۱۰۰ µg/ml بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته که از نظر اماری در سطح P<0.05 معنی دار بود. میزان IC50 برای داروی اگزالی پلاتین ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت محاسبه شد و تیمار سلول‌ها با این غلظت باعث القای آپوپتوز شد با افزایش غلظت اگزالی پلاتین درصد بقا سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۱).

آزمون MTT در تیمار سلول‌های HT29 با داروی پاکلی تاکسل به مدت ۲۴ ساعت

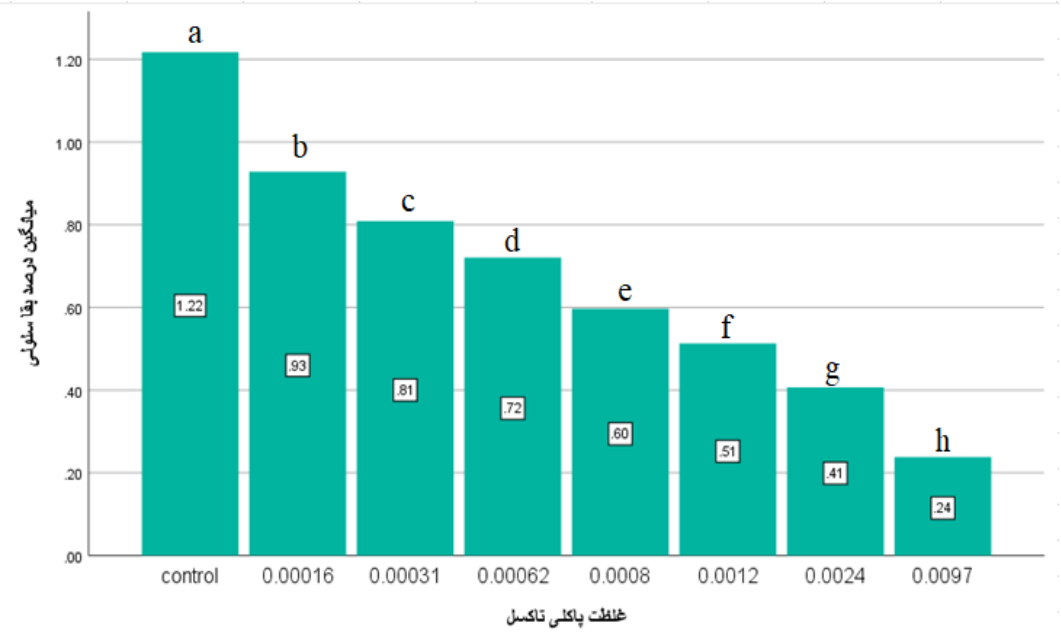
تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های مختلف۰/۰۰۰۱۶، ۰/۰۰۰۳۱، ۰/۰۰۰۶۲، ۰/۰۰۱۲، ۰/۰۰۲۴ و ۰/۰۰۹۷ میکرو مولار از داروی پاکلی تاکسل با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد داروی پاکلی تاکسل در غلظت ۰/۰۰۹۷ میکرومولار بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته که از نظر اماری معنی دار بوده است. میزان IC50 برای دارو پاکلی تاکسل ۰/۰۰۰۸ میکرو مولار در مدت زمان ۲۴ ساعت محاسبه شد و تیمار سلول‌ها با این غلظت باعث القای آپوپتوز شد با افزایش غلظت داروی پاکلی تاکسل درصد بقا سلولی به طور معنی‌داریکاهش یافت(شکل ۲).

آزمون MTT در تیمار سلول‌های HT29 با داروی اگزالی پلاتین و پاکلی تاکسل به مدت ۲۴ ساعت

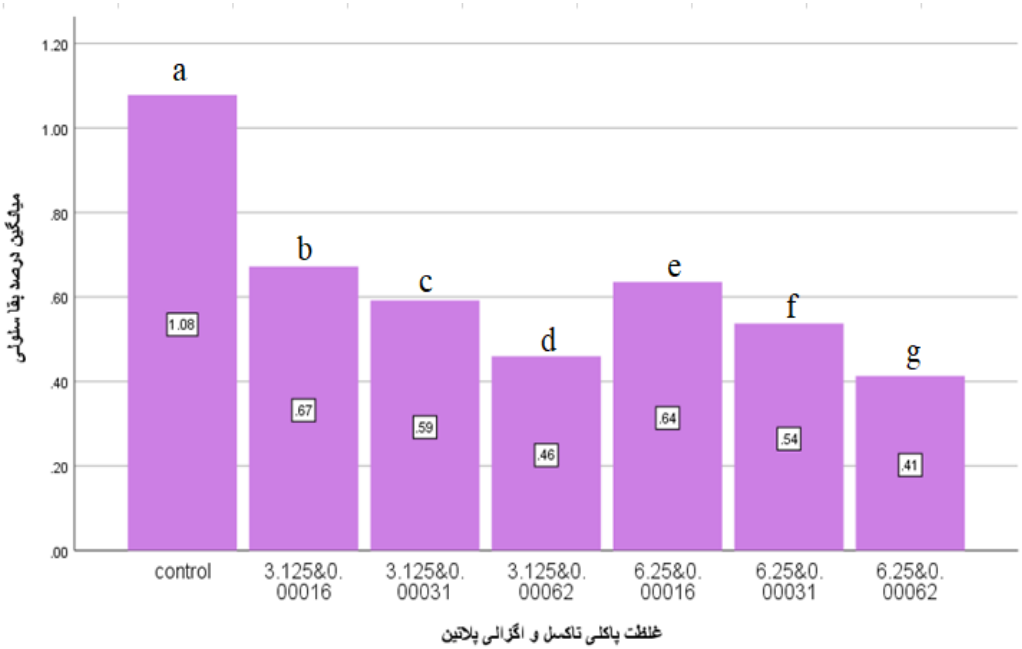
تیمار سلول‌های HT29 با غلظت‌های مختلف ۰/۰۰۰۱۶+ ۳/۱۲۵، ۰/۰۰۰۳۱+ ۳/۱۲۵، ۰/۰۰۰۶۲ + ۳/۱۲۵، ۰/۰۰۰۱۶+ ۶/۲۵، ۰/۰۰۰۳۱+ ۶/۲۵ و ۰/۰۰۰۶۲+ ۶/۲۵ µmol و µg/ml از داروهای پاکلی تاکسل و اگزالی پلاتین با استفاده از تست MTT طی مدت ۲۴ ساعت انجام شد. نتایج نشان داد داروی پاکلی تاکسل در غلظت ۰/۰۰۰۶۲ میکرو مولار و اگزالی پلاتین در غلظت۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته که از نظر آماری معنی‌دار بود. میزان IC50 برای داروی پاکلی تاکسل در غلظت ۳/۲۵ میکرو مولار و اگزالی پلاتین در غلظت۰/۰۰۰۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان ۲۴ ساعت بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت این دو دارو درصد بقا سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۱- درصد زیست پذیری سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی اگزالی پلاتین (برحسب میکروگرم بر میلی لیتر) در مدت زمان ۲۴ ساعت.



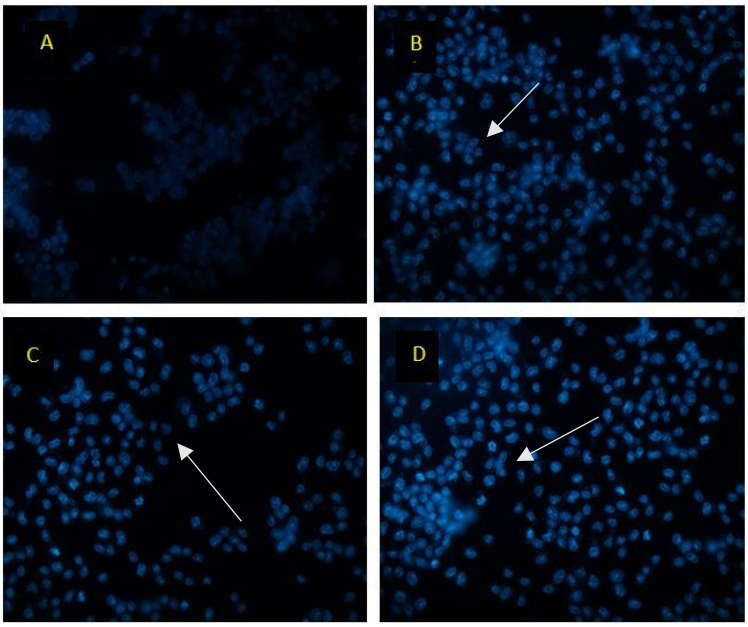
شکل ۲- درصد زیست پذیری سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی پاکلی تاکسل (برحسب میکروگرم بر میلی لیتر) در مدت زمان ۲۴ ساعت.



شکل ۳- درصد زیست پذیری سلول‌های HT29 تیمار شده با غلظت‌های مختلف داروی پاکلی تاکسل و اگزالی پلاتین (برحسب میکروگرم بر میلی لیتر) در مدت زمان ۲۴ ساعت.

بررسی تغییرات مورفولوژی هسته در سلول‌های تیماری با استفاده از رنگ‌آمیزی هسته‌ای DAPI

تصاویر حاصل از مطالعه میکروسکوپی، به شکلی واضح بیانگرقطعه قطعه شدن هسته‌هاو ایجاد تغییرات مورفولوژیک هم چون چروکیدگی هسته و تشکیل اجسام آپوپتوتیک در سلول‌های HT29 تیمارشده با غلظت‌های IC50 از پاکلی‌تاکسل(B) و داروی اگزالی‌پلاتین (C) و همچنین غلظت هم افزایی داروهای پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین (D) در مقایسه با هسته‌های سالم و یکپارچه گروه شاهد (A)، تایید کننده القا مرگ سلولی می‌باشد.



شکل ۴-تایید القا آپوپتوز و قطعه قطعه شدن DNA هسته سلول‌های HT29 بارنگ‌آمیزی DAPI (درشت نمایی ۱۰۰×).

A: گروه شاهد یکدست و سالم بودن هسته ی سلول‌ها- B: گروه تیمار شده با پاکلی‌تاکسل C : گروه تیمار شده با اگزالی‌پلاتین گروه D: گروه تیمار شده با داروی پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین.

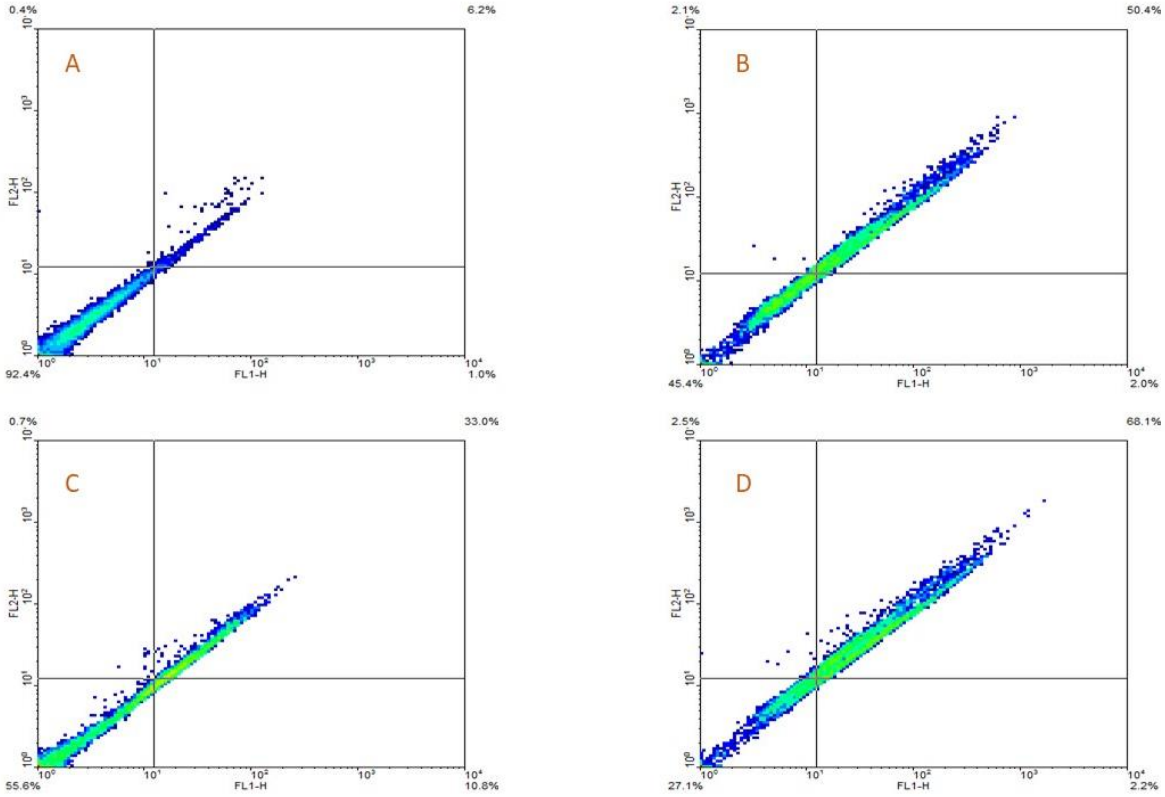
بررسی القای آپوپتوز با روش فلوسایتومتری آنکسین PI/V

همان گونه که در شکل۵ نشان داده شده است؛ غلظت‌های IC50 از پاکلی‌تاکسل (B) و داروی اگزالی‌پلاتین (C) و همچنین غلظت توام ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین (D) قادر به افزایش القا آ پوپتوزدر سلول‌های HT29 به صورت وابسته به دوز می‌باشد، به گونه‌ای که هریک از این داروها و هم افزایی آنها نه تنها باعث افزایش سلول‌های انکسین V مثبت می‌شود، بلکه به شکل بارزتری درصد سلول‌های انکسین PI/V مثبت را افزایش می‌دهد. در گروه شاهد بیش از ۹۲% از سلول‌ها زنده بوده و ۱% دچار آپوپتوز اولیه، ۶/۲% دچار آپوپتوز ثانویه و ۰/۴% دچار نکروز شده‌اند. در غلظت ۰/۰۰۰۸ ۰ میکرو مولار از پاکلی‌تاکسل درصد زنده‌مانی سلول‌ها به ۴۵/۴ درصد کاهش یافته است. تیمار سلول‌ها با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دارو نیز درصد زنده مانی سلول‌ها را ۵۵/۶% کاهش داده است. تیمار همزمان داروها به ترتیب با غلظت‌های ۶/۲۵ و ۰/۰۰۰۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر زنده‌مانی سلول‌ها را نسبت به گروه شاهد و تیمار تنها از دوزهای مناسب دارو، به ۲۷/۱% کاهش داده است. در همه‌ی گروه‌های تحت تیمار آپوپتوز با درصد قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد، در گروه B که سلول‌ها با پاکلی‌تاکسل تیمار شده بودند درصد آپوپتوز بیش از ۶ درصد نمایش داده شد درگروه C تیمار سلول‌ها با دوز ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اگزالی‌پلاتین باعث آپوپتوز ۴۳/۸ درصدی در سلول‌ها شد. تاثیر همزمان دو دارو، آپوپتوز را تا ۷۰/۳ درصد بالا برده است. نتایج این آزمون نیز اثر هم افزایی پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین را با هم تائید می‌کند.

بررسی تغییرات بیان ژن‌های کاسپاز ۳و۹و p53

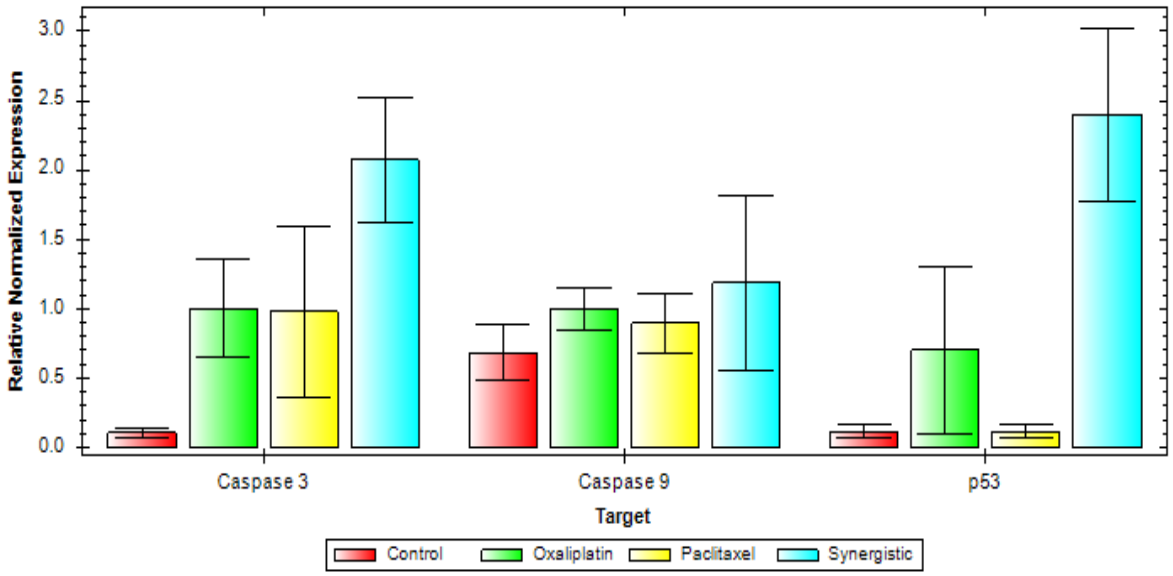
آنالیز تغییر بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳و۹وp53 در سلول‌های HT29 سرطانی کولون تیمار شده باغلظت‌های IC50 از پاکلی‌تاکسل ۰/۰۰۰۸ میکرو مولار و اگزالی‌پلاتین ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و هم چنین غلظت توام ۶/۲۵ میکرو مولار از پاکلی‌تاکسل به همراه ۰/۰۰۰۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از اگزالی‌پلاتین بعد از ۲۴ ساعت با روش Real-Time PCR انجام شد. همان گونه که در شکل۶ نشان داده شده است؛ بیان ژن‌های آپوپتوزی CAS3، CAS9 در رده سلول‌هایHT29 سرطان کولون تیمار شده با داروی پاکلی‌تاکسل و داروی اگزالی‌پلاتین و هم‌افزایی این دو دارو در سطح احتمال ۰/۰۵% تفاوت معنی‌دار مشاهده شد و بیان این ژن‌ها طی ۲۴ ساعت افزایش یافت. بیان ژن آپوپتوزی P53 در ابن سلول‌ها در تیمار جداگانه با دو دارو تفاوت معنی‌دار نشان نداد و منجر به افزایش

بیان این ژن نشد، اما پس از تیمار با هر دو دارو اثر هم‌افزایی مشاهده شد و افزایش معنی‌دار را نشان داد (شکل ۶).



شکل۵- بررسی اثر دارو پاکلی‌تاکسل و اگزالی پلاتین و هم افزایی این دو دارو بر القا مرگ سلولیدر رده سلولی HT29.

A: گروه شاهد زنده مانی درصد زیادی از سلول‌ها- B: گروه تیمار شده با پاکلی‌تاکسل C: گروه تیمار شده با اگزالی پلاتین- گروه D: گروه تیمار شده با داروی پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین.



نمودار۶- بیان ژنهای آپوپتوزی P53, CAS9,CAS3 در سلول‌های HT29 سرطان کولون تیمار شده توسط داروی پاکلی‌تاکسل و اگزالی پلاتین و هم افزایی دو دارو.

بحث

امروزه مراکز مطالعات سرطان در جستجوی عوامل ضد سرطان با ضریب اطمینان بالاتر و قابلیت پذیرش بیشتر برای بیماران هستند. در این میان درمان‌های هدف دار شده با اهداف مولکولی که در رشد یا پیشرفت تومور مداخله می‌کنند اختصاصیت بالایی به سلول‌های توموری دارند و رویکرد درمانی جدیدی با کاهش سمیت به روی علم سرطان‌شناسی باز نموده‌اند [۴]. با توجه به این که تغییرات ژنتیکی زیادی مورد نیاز است تا فرم سرطانی یک سلول ایجاد شود و به‌علت اینکه ایجاد بسیاری از سرطان‌ها جنبه ارثی دارد، استفاده از موادی که بتوانند فرایند متاستازی را مهار کنند، مورد توجه می‌باشد. یعنی اگرچه نمی‌توان از ایجاد تومور اولیه جلوگیری کرد، ولی این امکان وجود دارد که جلوی فرایند متاستازی که علت اصلی مرگ و میر بیماران سرطانی می‌باشد، گرفته شود [۱۳]. تاکنون مطالعات مختلفی در جهت استفاده از داروی اگزالی‌پلاتین در درمان انواع سرطان‌ها انجام شده است که نتایج این مطالعات با مطالعات ما همسو است. اثرات داروی اگزالی‌پلاتین در افزایش بیان ژن پروتئاز کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در مطالعات مختلف نشان داده شده است [۱۴]. اگزالی‌پلاتین علاوه بر سرطان کولورکتال، فعالیت قابل توجهی در انواع تومورها دارد. مطالعات نشان داده است که یکی از مکانیسم‌هایی که داروی اگزالی‌پلاتین رشد سلول‌های سرطانی روده را مهار می‌کند، آپوپتوز می‌باشد[۱۵]. مطالعات متعددی در مورد اثربخشی اگزالی‌پلاتین به عنوان درمان تک عاملی یا در ترکیب با سیس پلاتین یا پاکلی‌تاکسل در بیماران سرطان تخمدان پیشرفته تحت درمان گزارش شده است. پاکلی‌تاکسل در فرآیند تجزیه میکروتوبول‌ها در طول تقسیم سلولی اختلال ایجاد می‌کند و می‌تواند باعث آپوپتوز سلول‌های تحت درمان شود [۱۶]. در سال ۲۰۱۱ اوشله و همکاران نشان دادند که بقای طولانی مدت پس از درمان با جمسیتابین و اگزالی‌پلاتین با و بدون تیمار ثانویه پاکلی‌تاکسل در بیماران مبتلا به تومورهای سلول زایا مقاوم به سیس پلاتین و/یا عود مضاعف دیده می‌شود [۱۷]. در سال ۲۰۲۱ ژانگ و همکاران بیان کردند که شیمی درمانی ترکیبی مبتنی بر اگزالی‌پلاتین هنوز برای درمان سرطان اپی‌تلیال تخمدان عودکننده و مقاوم به پلاتین موثر است [۱۸]. در سال ۲۰۲۱ در مطالعه شی و همکاران استفاده از اگزالی‌پلاتین‌پلاس با پاکلی‌تاکسل به صورت داخل صفاقی برای درمان سرطان معده پیشرفته با متاستازهای صفاقی موفقیت‌آمیز بود [۱۹].

سایر مطالعات، فعالیت اگزالی‌پلاتین تک عاملی را در سرطان سینه متاستاتیک مقاوم به آنتراسایکلین و لنفوم غیر هوچکین مقاوم نشان داده است [۲۰]. یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳، ۹ و P53 بود. نتایج این مطالعه نشان داد که بعد از تیمار سلول‌های HT29 با داروهای پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین، بیان ژن‌های آپوپتوزی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار داشتند که نشان دهنده القای پدیده آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون می‌باشد. از آنجاکه فعالیت ژن‌های کاسپاز ۳، ۹ و P53 در اثر تیمار با داروی اگزالی‌پلاتین افزایش می‌یابد، به‌نظر می‌رسد که سیتوکروم C رها شده به‌درون سیتوزول به همراه کاسپاز ۳ و ۹ کمپلکس پروتئینی آپوپتوزوم را تشکیل می‌دهد و موجب القای آپوپتوز شده است [۲۱]. ژن p53 اغلب یک ژن جهش یافته است که در حدود ۵۰ درصد از سرطان‌های انسانی نقش دارد که نشان می‌دهد این ژن نقش مهمی در جلوگیری از تشکیل سرطان دارد. پروتئین‌هایی که توسط p53 کد می‌شوند به DNA متصل شده و در تنظیم بیان ژن برای جلوگیری از جهش ژنوم نقش دارند. هنگامی که p53 فعال می‌شود باعث توقف چرخه سلولی شده و اجازه می‌دهد بقای سلول یا آپوپتوز القاء شود [۲۲]. فعالیت دارویی یا مقاومت به اگزالی پلاتین ممکن است تحت تأثیر نوع بافت و برنامه درمان و هم چنین سایر عوامل از جمله وضعیت P53 قرار گیرد[۲۳].

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این پژوهش که تاثیر سیتوتوکسیک و القا فرایند آپوپتوزیس بر درصد زنده مانی و تکثیر سلول‌های HT29 سرطانی کلون توسط غلظت‌های مختلف از داروهای شیمی درمانی ضد سرطان کولون پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین و اثر توامان دو دارو نشان داده شد ، درصورتی که پروسه بالینی این داروها تایید شود، می‌تواند در موارد بالینی برای بیماران مبتلا به سرطان کولون به‌کار گرفته شوند. پیشنهاد می‌شود برای تایید اثرات ضد سرطان داروهای اگزالی پلاتین و پاکلی تاکسل در بدن موجودزنده، مطالعه تاثیرآنها روی مدل حیوانی و انسانی انجام گیرد و هم چنین اثر توام سایر داروهای شیمی درمانی موثر در درمان سرطان کولون به همراه پاکلی‌تاکسل و اگزالی‌پلاتین و

مسیر دقیق سیگنالینگ القا کننده‌ی آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون بررسی شود.

منابع

[1] Grimes M, Hall B, Foltz L, Levy T, Rikova K, Gaiser J, Cook W, Wheeler T., Clark N R, Lachmann A, Zhang B, Hornbeck P, Ma'ayan A, Comb M. Integration of protein phosphorylation, acetylation, and methylation data sets to outline lung cancer signaling networks. 2018; Sci Signal, 11(531). https://doi.org/10.1126/scisignal.aaq1087

[2] Haque I, Ghosh A, Acup S, Banerjee S, Dhar K, Ray A, Sarkar S, Kambhampati S, Banerjee S K. Leptin-induced ER-α-positive breast cancer cell viability and migration is mediated by suppressing CCN5-signaling via activating JAK/AKT/STAT-pathway. BMC Cancer, 2018; 18(1), 99. https://doi.org/10.1186/s12885-018-3993-6

[3] Levi M, Shalgi R, Brenner B, Perl G, Purim O, Amit L, Stemmer S M, Ben-Aharon I. The impact of oxaliplatin on the gonads: from bedside to the bench. Mol Hum Reprod, 2015; 21(12), 885-893. https://doi.org/10.1093/molehr/gav055

[4] Feng L X, Li M, Liu Y J, Yang S M, Zhang N. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of ceramide and docetaxel. Int J Mol Sci, 2014; 15(3), 4201-4220. https://doi.org/10.3390/ijms15034201

[5] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin, 2021; 71(3), 209-249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

[6] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. Prz Gastroenterol, 2019; 14(2), 89-103. https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072

[7] Mendiratta G, Ke E, Aziz M, Liarakos D, Tong M, Stites E C. Cancer gene mutation frequencies for the U.S. population. Nature Communications, 2021; 12(1), 5961. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26213-y

[8] Beijers A J, Mols F, Vreugdenhil G. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration. Support Care Cancer, 2015; 22(7), 1999-2007. https://doi.org/10.1007/s00520-014-2242-z

[9] Danciu C, Muntean D, Alexa E, Farcas C, Oprean C, Zupko I, Bor A, Minda D, Proks M, Buda V, Hancianu M, Cioanca O, Soica C, Popescu S, Dehelean C A. Phytochemical Characterization and Evaluation of the Antimicrobial, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Potential of Ephedra alata Decne. Hydroalcoholic Extract against the MCF-7 Breast Cancer Cell Line. Molecules, 2018; 24(1). https://doi.org/10.3390/molecules24010013

[10] Azman A S, Othman I, Fang C M, Chan K G, Goh B H, Lee L H. Antibacterial, Anticancer and Neuroprotective Activities of Rare Actinobacteria from Mangrove Forest Soils. Indian J Microbiol,2017; 57(2), 177-187. https://doi.org/10.1007/s12088-016-0627-z

[11] Fujie Y, Yamamoto H, Ngan C Y, Takagi A, Hayashi T, Suzuki R, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. Jpn J Clin Oncol, 2005; 35(8), 453-463. https://doi.org/10.1093/jjco/hyi130

[12] Hopkins B D, Goncalves M D, Cantley L C. Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism. J Clin Oncol, 2016; 34(35), 4277-4283. https://doi.org/10.1200/jco.2016.67.9712

[13] Kratz F, Müller I A, Ryppa C, Warnecke A. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. ChemMedChem, 2008; 3(1), 20-53. https://doi.org/10.1002/cmdc.200700159

[14] MacKenzie S H, Clark A C. Targeting cell death in tumors by activating caspases. Curr Cancer Drug Targets, 2008; 8(2), 98-109. https://doi.org/10.2174/156800908783769391

[15] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495-516

[16] Ahmed AA, Wang X, Lu Z, et al. Modulating microtubule stability enhances the cytotoxic response of cancer cells to paclitaxel. Cancer Res. 2011; 71(17): 5806–5817.

[17] Oechsle K, Kollmannsberger C, Honecker F, Mayer F. Long-term survival after treatment with gemcitabine and oxaliplatin with and without paclitaxel plus secondary surgery in patients with cisplatin-refractory and/or multiply relapsed germ cell tumors. Eur Urol, 2011; 60(4):850-5. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.019.

[18] Zhang Y, Li C, Qin Y. Small extracellular vesicles ameliorate peripheral neuropathy and enhance chemotherapy of oxaliplatin on ovarian cancer. J. E. V., (2021); 10 (5). https://doi.org/10.1002/jev2.12073

[19] Shi M, Yang Z, Lu S. Oxaliplatin plus S-1 with intraperitoneal paclitaxel for the treatment of Chinese advanced gastric cancer with peritoneal metastases. BMC Cancer, 2021; 21, 1344. https://doi.org/10.1186/s12885-021-09027-5

[20] Berlin JD, Venook A, Bergsland E, Rothenberg M, Lockhart AC, Rosen L. Colorectal Cancer. 2008;7(1): 44-7. doi: 10.3816/CCC.2008.n.006.

[21] Cook L M, Hurst D R, Welch D R. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. Semin Cancer Biol, 2011; 21(2), 113-122. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.12.005

[22] Arnold J, David P. The P53 family: a subject collection from cold spring Harbor perspectives in biology laboratory press. Molecular cancer, 2010; 126:273-84.

[23] Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family) J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006; 19: 879–886. doi:10.1124/jpet.106.110346.

Investigation of effect of oxaliplatin and paclitaxel drugs on colon cancer cells (HT29) and analysis of apoptotic genes expression caspase 3, caspase 9 and P53

Mahmoodzadeh H.[1*], Baharara J.[2], Rezaee Daloui Y.[3]

[1] Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
[2] Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
[3] Cellular and Molecular Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

* (Corresponding author): h.mahmoodzadeh@mshdiau.ac.ir

DOI: 10.30495/jdb.2023.1966139.1329 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.3.5

Received: August 2022 Accepted: January.2023

Abstract

In this study the effects of paclitaxel and oxaliplatin on colon cancer cell line (HT29) and expression of apoptotic genes caspase 3, 9, and p53 were examined. Using the MTT method, the cytotoxicity of paclitaxel and oxaliplatin and synergic effect at different concentrations on the HT29 cell line was assessed. The IC50 of paclitaxel and oxaliplatin was determined.The expression level of caspase 3 and 9 was assessed using the Real-Time PCR method after the cells had been exposed to the IC50 concentration. Apoptosis of the cells was done using Annexin V/PI and DAPI staining. The treatment of cells revealed that paclitaxel and oxaliplatin at concentrations of 3.25 and 0.00062 µg/ml, respectively, have the most cytotoxic effects and its IC50 value was determined to be 12.5 µg/ml and 0.00016 and treatment groups at concentrations of 3.25 and 0.00062 µg/ml, respectively, decreased the cell viability and its IC50 value was determined to be 12.5 µg/ml and0.00016µg/m. The expression level of caspase 3 and 9 P53 was also increased in the treated colon cancer cell line. DAPI staining showed apoptosis in the simultaneous treatment groups with. Using Annexin V/PI reveals that 98 percent of the cells in the control group are healthy and a considerable number of the cells in the treated groups have undergone apoptosis. Is. It is clear that paclitaxel and oxaliplatin are effective options for treating colon cancer given their cytotoxicity and stimulation of the apoptotic process in colon cancer cell lines.

Keywords: Oxaliplatin, paclitaxel, colon cancer, annexin, caspase gene, p53 ge.